

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



**Estudo de ingredientes de *Salvia sclareoides* – um contributo
para o desenvolvimento de um potencial suplemento alimentar**

Luísa Maria de Campos Abraços

Versão Pública

Mestrado em Química
Especialização em Química

Dissertação orientada por:
Professora Doutora Amélia Pilar Rauter
Doutora Alice Martins

2017

Agradecimentos

A realização deste trabalho não teria sido possível sem a contribuição de algumas pessoas que merecem a minha especial consideração. A todas expresso o meu sincero agradecimento.

À minha orientadora Professora Doutora Amélia Pilar Rauter, do Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências, agradeço a simpatia, os conhecimentos transmitidos e orientação pedagógica e científica necessários para a realização deste trabalho.

À coorientadora Doutora Alice Martins, do Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências, agradeço a amizade, a enorme disponibilidade e paciência ao longo deste trabalho.

Agradeço à Doutora Paula Batista, do Instituto Superior de Agronomia, a colaboração e orientação necessárias na preparação das bolachas e na caracterização física das mesmas.

À Mestre Tânia Albuquerque e Mestre Mafalda Silva, do Instituto Doutor Ricardo Jorge, agradeço a colaboração e orientação na realização das análises nutricionais das bolachas.

Desejo agradecer à Professora Doutora Luísa Serralheiro, do Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências, por ter proporcionado a liofilização de alguns dos extratos e a realização do teste de atividade anticolinesterásica. Agradeço também à Laura, a disponibilidade e colaboração na realização deste ensaio.

Um sincero agradecimento ao Doutor Nuno Neng, do Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências, pela realização das análises de HPLC-DAD.

E, para finalizar, um obrigada cheio de carinho aos meus pais, ao Sérgio, à minha filha Alexandra, à minha colega Maria João e aos meus amigos de sempre. Obrigada por acreditarem em mim!

Resumo

A *Salvia sclareoides* é uma planta da vegetação espontânea portuguesa que possui propriedades relevantes, no âmbito da sua ação a nível colinérgico e na prevenção de formação de placas amiloides. Os estudos sugerem que esta espécie de *Salvia* poderá ser usada como alimento funcional e, também, no desenvolvimento de um suplemento alimentar, no âmbito da prevenção e tratamento da doença de Alzheimer.

Em colaboração com o Instituto Superior de Agronomia (ISA), foram desenvolvidas bolachas doces e salgadas com a incorporação de diferentes concentrações (2% e 5%) de *S. sclareoides* cultivada. O material vegetal seco foi previamente moído de modo a obter um pó com granulometria de 0,12 mm e 2,00 mm, posteriormente incorporado nas bolachas. As massas das bolachas foram preparadas com 2% e 5% de *S. sclareoides* para cada granulometria a partir de uma formulação desenvolvida pelo grupo de investigação do ISA. Foram realizadas as seguintes análises físicas: avaliação instrumental da cor pelo sistema CIELab, análise de textura, atividade da água (a_w), determinação da capacidade de absorção de água e óleo pela *S. sclareoides* pulverizada.

Em colaboração com o Instituto Doutor Ricardo Jorge, foi determinada a composição nutricional das bolachas tendo sido quantificados os seguintes parâmetros: teor de humidade, cinza, proteína, gordura, fibra alimentar e sal. Os hidratos de carbono disponíveis e o valor energético foram obtidos por cálculo. Foi também determinada a composição em ácidos gordos através de GC-FID.

Paralelamente, foram preparados extratos a partir da parte aérea seca da planta. Testaram-se diferentes metodologias de extração: a frio (maceração) e a quente (Soxhlet) com etanol e com água (infusão). Os extratos obtidos foram analisados com vista à determinação do seu conteúdo em fenóis totais, através do método de Folin-Ciocalteu, e o perfil fenólico determinado por HPLC-DAD. O extrato etanólico de *S. sclareoides*, com granulometria de 2,00 mm, foi o que apresentou maior concentração de compostos fenólicos (143,74 mg GAE/g extrato seco) e o aquoso o que apresentou menor quantidade (55,21 mg GAE/g de extrato seco). Os flavonóides rutina e (7-*O*-glucosil)luteolina são, claramente, os constituintes maioritários presentes em todos os extratos, a par da epicatequina, do ácido elágico e de (7-*O*-glucosil)naringenina.

A atividade antioxidante foi avaliada pelo método do DPPH, tendo-se verificado que o extrato da planta com granulometria de 2,00 mm foi o que revelou atividade antioxidante mais elevada (68,45%). O extrato obtido a partir da infusão registou a atividade mais baixa (26,37%). Verificou-se, também, uma boa correlação entre o conteúdo fenólico e a atividade antioxidante dos extratos.

Efetuiu-se um estudo comparativo entre as atividades anti-inflamatória dos extratos obtidos a quente e a frio, não tendo sido observadas diferenças significativas na capacidade de inibirem a desnaturação térmica da albumina do soro bovino (BSA), exibindo ambos os extratos inibições na ordem dos 25%.

Avaliou-se ainda a atividade anticolinesterásica de alguns extratos, recorrendo ao método de Ellman, sendo o extrato obtido a partir das bolachas salgadas com 5% de planta o que apresentou maior percentagem de inibição da acetilcolinesterase (44,4%).

A citotoxicidade dos extratos foi avaliada *in vitro* em células Caco-2 pelo método do MTT, verificando-se que, até 2 mg/mL, os extratos não afetam significativamente a viabilidade celular, sugerindo que não haverá riscos de toxicidade para as concentrações de planta incorporada nas bolachas.

Palavras-chave: *S. sclareoides*, bolachas, composição nutricional, textura e ingrediente funcional.

Abstract

Salvia sclareoides is a plant of spontaneous Portuguese vegetation that has relevant properties, as part of its cholinergic action and in the prevention of the formation of amyloid plaques. The studies suggest that this species of *Salvia* can be used as a functional food and also in the development of a food supplement in the context of the prevention and treatment of Alzheimer's disease.

In collaboration with the Instituto Superior de Agronomia (ISA) sweet and salty cookies were developed with the incorporation of different concentrations (2% and 5%) of *S. sclareoides*.

The dried vegetable material was previously milled in order to obtain a powder with grain size of 0.12 mm and 2.00 mm, to be incorporated into the cookies. The dough's were prepared with 2% and 5% *S. sclareoides* for each grain size from a formulation developed by the ISA research group. The following physical analyzes were carried out: instrumental evaluation of the color by the CIELab system, texture analysis, water activity (a_w), determination of water and oil absorption capacity by sprayed *S. sclareoides*.

In collaboration with the Instituto Ricardo Jorge, the nutritional composition of the cookies was determined and the following parameters were quantified: moisture content, ash, protein, fat, dietary fiber and salt. The available carbohydrates and the energetic value were obtained by calculation. The fatty acid composition was determined by GC-FID.

In parallel, extracts were prepared from the dried aerial parts of the plant. Different extraction methodologies were tested: cold (maceration) and hot (Soxhlet) with ethanol and water (infusion). The obtained extracts were analyzed for the determination of their content in total phenols by the Folin-Ciocalteu method and the phenolic profile determined by HPLC-DAD. The ethanol extract of *S. sclareoides*, with 2.00 mm grain size, presented the highest concentration of phenolic compounds (143.74 mg GAE/g dry extract) and the aqueous one the lowest amount (55.21 mg GAE/g dry extract). The flavonoids rutin and (7-*O*-glucosyl)luteolin are clearly the major constituents present in all extracts, along with epicatechin, ellagic acid and (7-*O*-glucosyl)naringenin.

The antioxidant activity was evaluated by the DPPH method, and it was verified that the extract of the plant with grain size of 2.00 mm showed the highest antioxidant activity (68.45%), while the infusion extract had the lowest one (26.37%). In addition, a good correlation between the phenolic content and the antioxidant activity of the extracts was observed.

A comparative study was carried out between the anti-inflammatory activities of the hot and cold extracts, and no significant differences in the ability to inhibit the thermal denaturation of bovine serum albumin were found for both extracts, which showed around 25% inhibition.

It was also evaluated the anticholinesterase activity of some extracts, using the Ellman method, and the extract obtained from the salted cookies with 5% of plant showed the best acetylcholinesterase inhibition (44.4%). Finally, the cytotoxicity of extracts was evaluated *in vitro* on Caco-2 cells by the MTT method. Extracts concentration up to 2 mg/mL did not affect significantly cell viability, suggesting that, at least with the amount of plant added to the cookies, no toxicity is expected.

Key words: *S. sclareoides*, cookies, nutritional composition, texture and functional ingredient

Abreviaturas

a_w - Atividade da água
ABS - Absorvância
ACh - Acetilcolina
AChE - Acetilcolinesterase
AG - Ácidos gordos
AGS - Ácidos gordos saturados
AGMI - Ácidos gordos monoinsaturados
AGPI - Ácidos gordos polinsaturados
AGT - Ácidos gordos *trans*
AChI - Iodeto de acetiltiocolina
BSA - Albumina do soro bovino
DMSO - Dimetilsulfoxido
DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo
DTNB - 5,5'- ditiobis[2-nitrobenzoato]
EtOH - Etanol
FAME - Éster metílico do ácido gordo (do inglês *fatty acid methyl ester*)
FC - Folin-Ciocalteu
GAE - Equivalentes em ácido gálico
GC-FID - Cromatografia gasosa com detetor de ionização de chama
IC₅₀ - Concentração que corresponde a 50% de inibição
p - Grau de significância
p.a. - Pro analysis
MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NMR - Ressonância Magnética Nuclear
SNC - Sistema nervoso central
SNP - Sistema nervoso periférico
 t_r - Tempo de retenção
UV - Ultravioleta

Índice

Agradecimentos	i
Resumo e palavras-chave	ii
Abstract and key words	iv
Abreviaturas	v
Índice	vi
Índice de Figuras	viii
Índice de Tabelas	viii
1. Introdução	1
1.1. Género <i>Salvia</i>	2
1.2. Caracterização fitoquímica	3
1.3. Atividades biológicas em espécies de <i>Salvia</i>	6
1.3.1. Atividade antioxidante	7
1.3.2. Atividade anticolinesterásica	7
1.4. Produção de bolachas	8
1.4.1. Caracterização geral de bolachas	8
1.4.2. Principais ingredientes usados na preparação de bolachas	8
1.4.2.1. Farinha	9
1.4.2.2. Gordura	9
1.4.2.3. Açúcar	10
1.4.2.4. Água	10
1.4.2.5. Fermento	11
1.4.2.6. Sal	11
1.4.3. Caracterização física das bolachas	11
1.4.3.1. Textura	11
1.4.3.2. Avaliação instrumental da cor	12
1.4.3.3. Atividade da água	13
1.4.4. Declaração nutricional	14
2. Materiais e Métodos	16
2.1. Materiais	16
2.1.1. Material vegetal	16
2.1.2. Ingredientes utilizados na preparação das bolachas	16
2.1.3. Reagentes e solventes e consumíveis diversos	16
2.1.4. Equipamento	17
2.2. Métodos	19
2.2.1. Confeção das bolachas	19
2.2.1.1. Preparação do material vegetal para incorporação	19
2.2.1.2. Preparação das bolachas	19
2.2.1.3. Análises físicas das bolachas	21
2.2.1.3.1. Índice de absorção de água e Capacidade de absorção de óleo das amostras pulverizadas de <i>S. sclareoides</i>	21
2.2.1.3.2. Avaliação instrumental da cor	22
2.2.1.3.3. Determinação das dimensões	22
2.2.1.3.4. Análise de textura	22
2.2.1.3.5. Análise da atividade da água (a_w)	22
2.2.1.4. Análise nutricional das bolachas	23
2.2.1.4.1. Determinação da humidade	23

2.2.1.4.2. Determinação das proteínas	23
2.2.1.4.3. Determinação da gordura total	24
2.2.1.4.4. Determinação das cinzas	24
2.2.1.4.5. Determinação da fibra alimentar	24
2.2.1.4.6. Determinação do teor de sal	25
2.2.1.4.7. Determinação de hidratos de carbono	26
2.2.1.4.8. Determinação da composição em ácidos gordos	26
2.2.2. Preparação dos extratos	26
2.2.2.1. Extratos brutos de <i>S. sclareoides</i>	26
2.2.2.2. Extratos de bolachas com <i>S. sclareoides</i>	27
2.2.3. Caracterização química dos extratos	28
2.2.3.1. Determinação do teor de fenóis totais	28
2.2.3.2. Caracterização do perfil fenólico dos extratos	29
2.2.4. Caracterização biológica dos extratos	29
2.2.4.1. Determinação da citotoxicidade	29
2.2.4.2. Actividade antioxidante	31
2.2.4.3. Actividade anticolinesterásica	31
2.2.4.4. Actividade anti-inflamatória	32
4. Conclusões	35
5. Bibliografia	38

Índice de Figuras

Figura 1.1- <i>Salvia officinalis</i> L. (a), <i>Salvia sclarea</i> L. (b) e <i>Salvia sclareoides</i> (c).	2
Figura 1.2- Estruturas de ácidos fenólicos encontrados em espécies de <i>Salvia</i> .	4
Figura 1.3- Diterpenos fenólicos com atividade antioxidante encontrados em espécies de <i>Salvia</i> .	5
Figura 1.4- Flavonas e esteróis encontrados em espécies do género <i>Salvia</i> .	5
Figura 1.5- Estrutura dos compostos isolados da <i>S. sclareoides</i> .	6
Figura 1.6- Texturómetro, durante um ensaio de textura.	12
Figura 1.7- Espaço de cor L*, a*, b*.	13
Figura 1.8- Porção do diagrama de cromaticidade a*, b* onde é possível observar a posição de A que corresponde à cor vermelha de uma maçã.	13
Figura 2.1- Moinho de rotor com velocidade variável, Fritsch (d); Visualização do material vegetal após a pulverização, crivo de 2,0 mm (e) e crivo de 0,12 mm (f).	19
Figura 2.2- Fluxograma do processo de produção das bolachas doces com <i>S. sclareoides</i> incorporada.	20
Figura 2.3- Fluxograma do processo de produção das bolachas salgadas com <i>S. sclareoides</i> incorporada.	20
Figura 2.4- <i>S. sclareoides</i> seca e fragmentada (g), pulverizada com granulometria de 2,0 mm (h) e de 0,12 mm (i).	26
Figura 2.5- Montagem para a extração a quente da <i>S. sclareoides</i> fragmentada (j) e pulverizada (k) Extração por infusão em água destilada (l).	27
Figura 2.6- Esquema reacional da redução do reagente MTT pelas desidrogenases mitocondriais.	30
Figura 2.7- Esquema reacional da redução do DPPH.	31
Figura 2.8- Esquema reacional da hidrólise da acetiltiocolina na presença de acetilcolinesterase, formando-se os produtos acetato e tiocolina.	32

Índice de Tabelas

Tabela 1.1- Espécies de <i>Salvia</i> da vegetação espontânea portuguesa.	3
Tabela 2.3- Preparação dos padrões de calibração	28

Capítulo I

Introdução

1. Introdução

Assiste-se, atualmente, a um envelhecimento acelerado da população mundial, sendo certo que, ao longo do século XXI, irá ocorrer um envelhecimento ainda mais rápido do que nos últimos 100 anos. A melhoria das condições de vida e dos cuidados de saúde, a par da redução da taxa de natalidade, sobretudo nos países desenvolvidos, tem contribuído para este fenómeno. Portugal é, aliás, um bom exemplo destas mudanças atendendo a que, desde 1960, a esperança média de vida aumentou mais de 16 anos. Esta evolução terá um impacto significativo na sociedade, estimando-se que, a partir de 2048, mais de metade da população terá mais de 50 anos.

Mas, ao mesmo tempo que se observa um aumento da longevidade das populações, agravam-se os problemas de saúde decorrentes de maus hábitos alimentares. Segundo a Organização Mundial de Saúde, não restam dúvidas de que o aumento de doenças crónicas em países desenvolvidos e em desenvolvimento está intimamente relacionado com alterações na dieta alimentar e estilos de vida. Assiste-se a um aumento generalizado dos casos de cancro, diabetes, obesidade, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas. Dentro destas últimas, a doença de Alzheimer, a forma mais comum de demência, tem aumentado a uma velocidade galopante. Esta enfermidade caracteriza-se por uma deterioração generalizada, progressiva e irreversível de diversas funções cognitivas, acompanhada da perda das capacidades física, psíquica e funcional da pessoa idosa. Para além de fatores genéticos e hormonais, intoxicações por metais pesados, infeções e diabetes, as deficiências nutricionais encontram-se também envolvidas no desenvolvimento desta doença. Até à presente data, não existe uma terapêutica eficaz contra esta patologia, pelo que, a aposta na prevenção, através da adoção de um estilo de vida saudável, incentivando a prática de exercício físico e de uma alimentação cuidada, poderão contribuir para evitar ou, pelo menos, retardar o aparecimento da doença.

O desenvolvimento de alimentos funcionais requer um esforço significativo na investigação de novos ingredientes e correspondentes benefícios fisiológicos. A utilização dos benefícios funcionais dos alimentos como instrumento de promoção de produtos tem sido fator favorecedor de diferenciação e de marketing. Apesar disso, algumas alegações de benefícios para a saúde dos alimentos têm sido postas em causa, cabendo aos agentes reguladores de cada país atuar de forma a garantir a correta informação aos consumidores. Na Europa, cabe à Agência de Segurança Alimentar Europeia (EFSA) pronunciar-se sobre as alegações de saúde dos alimentos, sendo o processo de regulação posteriormente convertido em legislação. A evidência científica da contribuição positiva de determinados alimentos deverá conduzir a uma resposta integrada entre as autoridades responsáveis e a cadeia de produção alimentar. Os alimentos funcionais entraram em força no mercado global nas últimas décadas, representando uma aposta lucrativa para as empresas agro-industriais e a sua procura não pára de crescer. Na verdade, existe cada vez mais uma tomada de consciência das populações para a estreita relação entre alimentação e saúde, revertendo em benefícios tanto para os consumidores como para os agentes económicos.

O trabalho aqui apresentado pretende ir ao encontro destas tendências através do estudo da incorporação de *Salvia sclareoides* num produto alimentar. Esta espécie de *Salvia* é uma planta endémica do sudoeste da Península Ibérica, que, nos últimos anos, foi alvo de vários estudos científicos pelo Grupo de Química dos Glúcidos do CQB. Tais estudos revelaram a capacidade neuroprotetora de diferentes extratos obtidos desta espécie, reforçando o seu potencial para fins nutracêuticos.

A incorporação da *S. sclareoides* cultivada num alimento, mais concretamente em bolachas doces e salgadas, de forma a transformá-las num alimento funcional para a prevenção de doenças neurodegenerativas é o principal objetivo do presente trabalho. A preparação de extratos a partir desta planta e o estudo das suas bioatividades, são igualmente importantes, e podem contribuir para o

desenvolvimento de um suplemento alimentar. Assim, com vista à concretização destes objetivos, foram definidas as seguintes etapas:

- Preparação de bolachas doces e salgadas com diferentes concentrações de *S. sclareoides*;
- Determinação da composição nutricional das bolachas;
- Preparação de extratos a partir da planta seca e das bolachas;
- Caracterização dos vários extratos quanto ao teor em fenóis totais;
- Identificação do perfil fenólico dos extratos da planta;
- Avaliação *in vitro* da citotoxicidade e das atividades antioxidante, anti-inflamatória e anticolinesterásica dos extratos da planta e das bolachas.

Nos subcapítulos seguintes apresentar-se-á um breve desenvolvimento teórico sobre a *Salvia*, nomeadamente a sua caracterização fitoquímica e atividades biológicas mais importantes, seguindo-se alguns conceitos relacionados com os principais parâmetros físicos e características nutricionais das bolachas.

1.1. Género *Salvia*

O género *Salvia* pertence à família *Lamiaceae*, a qual compreende 900 espécies distribuídas por várias regiões do mundo, como a Europa, Ásia, Ilhas do Pacífico, África tropical e América (Jash, Gorai e Roy, 2016).

O nome *Salvia* deriva do termo latino "*salvare*" que significa "curar", sendo considerada pelos nossos antepassados como uma planta milagrosa. De facto, as espécies de *Salvia* são muito populares na medicina tradicional devido às suas propriedades terapêuticas e têm sido usadas no tratamento de constipações, bronquite, feridas e infeções cutâneas, desordens menstruais, cefaleia, isquemia cerebral, problemas de memória e hepatite (Jash, Gorai e Roy, 2016).

As espécies mais conhecidas são a salvia comum (*Salvia officinalis* L.), a salva esclarea (*Salvia sclarea*) (Figura 1.1), a salvia trilobada (*Salvia fruticosa* Mill.) e a salvia espanhola (*Salvia lavandulifolia* Vahl).



Figura 1.1- *Salvia officinalis* L. (a), *Salvia sclarea* L. (b) e *Salvia sclareoides* (c) (Jardim Botânico da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro; Jorge, Loureiro e Castro, 2015).

Em Portugal, a *S. officinalis* é largamente cultivada e comercializada seca ou em vaso. Nativa da região do Mediterrâneo, esta espécie de *Salvia* é uma planta perene, subarborescente, muito ramificada, com folhas verde-acinzentadas e flores azuis violeta. Além do uso gastronómico, as suas folhas são usadas para extrair óleo essencial que possui propriedades terapêuticas e é rico em compostos fenólicos, como por exemplo o ácido rosmarínico e outros metabolitos com valor medicinal como os monoterpenos (α - e β -tuiona, 1,8-cineol, cânfora), diterpenos (ácido carnósico), e triterpenos (ácido ursólico e oleanólico) (Abu-Darwish et al, 2013).

Em Portugal, existem várias espécies de *Salvia* (Tabela 1.1) que crescem espontaneamente em determinadas zonas do país. São elas a *Salvia aethiopis*, *Salvia argentea*, *Salvia fruticosa* Mill, *Salvia sclarea*, *Salvia sclareoides* e a *Salvia officinalis*, esta última como subespontânea (Proença da Cunha, 2003).

Tabela 1.1- Espécies de *Salvia* da vegetação espontânea portuguesa.

Espécie	Nome comum	Local	Referência
<i>Salvia officinalis</i>	Chá da Europa ou Salva mansa (entre outros)	Ubíqua	Proença da Cunha, 2003
<i>Salvia aethiopis</i>	Salva da Etiópia	Em lugares secos e incultos nos arredores de Bragança e Mirandela.	Proença da Cunha, 2003
<i>Salvia argentea</i>	Salva larga	Terrenos incultos, searas e nas margens dos campos, no Alentejo e Algarve. É cultivada como ornamental.	Proença da Cunha, 2003
<i>Salvia fruticosa</i> Mill	Salva trilobada ou Salva da Grécia	Zona da Arrábida e no Algarve.	Proença da Cunha, 2003
<i>Salvia sclarea</i>	Salva esclarea	Arredores de Bragança e no Noroeste transmontano	Proença da Cunha, 2003
<i>Salvia sclareoides</i>	-	Estuário do Lizandro em Mafra e Coimbra.	Rauter et al., 2007 Jorge et al., 2015

1.2. Caracterização fitoquímica

Os compostos fenólicos fazem parte de um grupo vasto de fitoquímicos que resultam do metabolismo secundário das plantas, sendo essenciais para o seu crescimento, reprodução e pigmentação. Os compostos fenólicos incluem uma grande diversidade de estruturas, simples e complexas, sendo a sua estrutura molecular básica constituída, pelo menos, por um anel aromático no qual se ligam um ou mais grupos hidroxilo (-OH).

Os milhares de compostos fenólicos podem ser agrupados em diferentes classes, de acordo com a sua estrutura química (tais como o tipo e o número de anéis aromáticos), e em diferentes subclasses, de

acordo com os substituintes no anel aromático, associação a açúcares e formas de polimerização. Genericamente, podem ser divididos em flavonóides (flavonóis, flavonas, flavanóis, flavanonas, antocianinas e isoflavonas), ácidos fenólicos (derivados do ácido benzóico e do ácido cinâmico), estilbenos e lignanos (Manach et al., 2004). Em extratos obtidos a partir das partes aéreas de espécies de *Salvia* já foram identificados vários compostos bioativos. Dos ácidos fenólicos (Figura 1.2) encontrados, destacam-se o ácido cafeico (**1**), ferúlico (**2**), rosmarínico (**3**), gálico (**4**), hidroxibenzoico (**5**), vanílico (**6**), cumárico (**7**) e clorogénico (**8**).

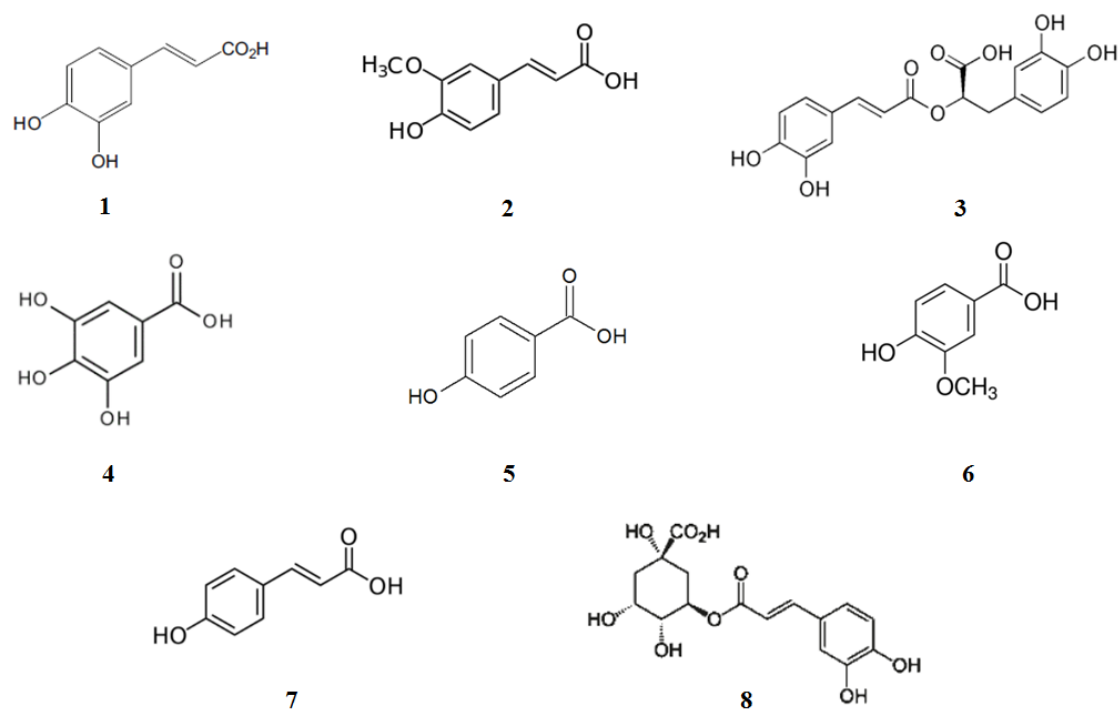


Figura 1.2- Estruturas de ácidos fenólicos encontrados em espécies de *Salvia*.

Os diterpenos fenólicos (Figura 1.3), ácido carnósico (**9**), carnosol (**10**), rosmanol (**11**), isorosmanol (**12**), epirosmanol e o galdosol (**13**) isolados de *S. officinalis* demonstraram elevada atividade antioxidante quando avaliada pelo método do DPPH (Jassbi et al., 2016).

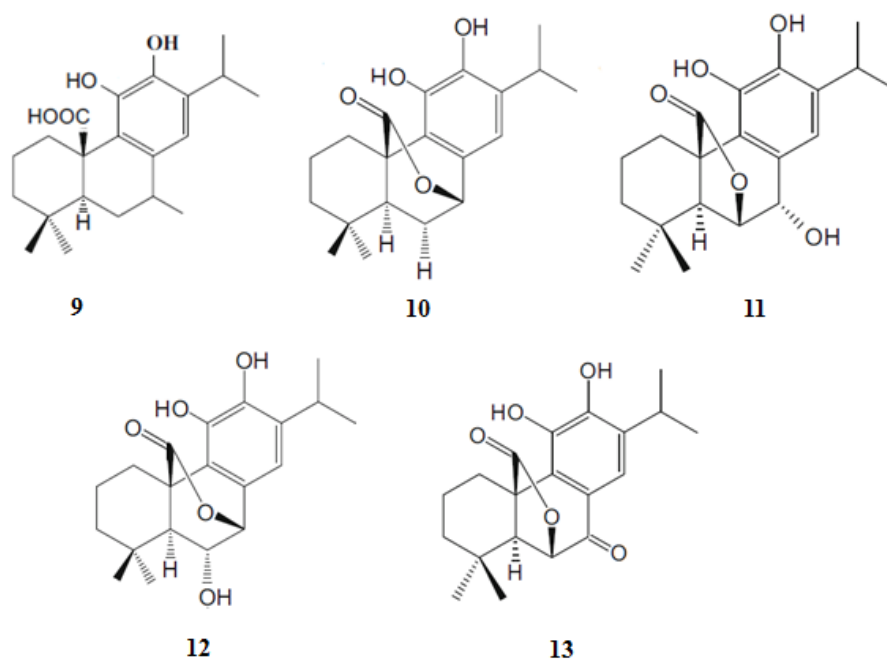


Figura 1.3- Diterpenos fenólicos com atividade antioxidante encontrados em espécies de *Salvia* (Jassbi *et al.*, 2015).

Diversos estudos têm demonstrado a existência de flavonóides ativos nas espécies *S. officinalis*, *S. plebeia* e *S. verbenaca* (Farhata et al., 2013; Jassbi et al., 2016). Mais recentemente, Salimikia e colaboradores (2016) isolaram, pela primeira vez, da espécie *S. chloroleuca* as flavonas salvigenina (**14**), luteolina (**15**) e cirsiol (**16**) e também os esteróis β -sitosterol (**17**) e daucosterol (**18**) (Figura 1.4). Demonstraram a existência de uma correlação significativa entre o conteúdo total em compostos fenólicos nos extratos e a atividade antioxidante testada pelo método FRAP, resultado que é compatível com outros estudos sobre a *Salvia*. Assumiram, também, que a atividade antioxidante observada nos extratos de *S. chloroleuca* poderá estar relacionada, em parte, com o seu conteúdo em flavonóides uma vez que esta classe de compostos possui atividade antioxidante e está largamente distribuída em espécies de *Salvia*.

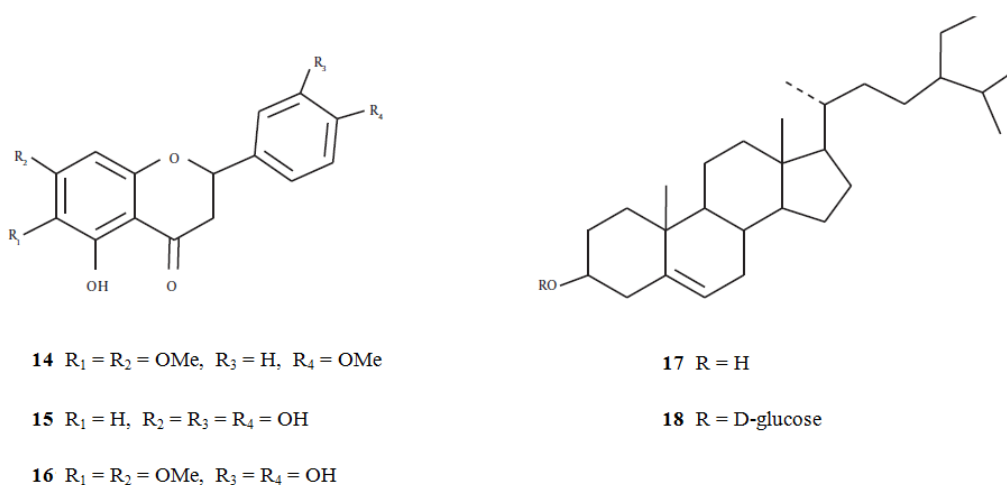


Figura 1.4- Flavonas e esteróis encontrados em espécies do gênero *Salvia* (Salimikia et al., 2016).

Rauter e colaboradores isolaram do extrato em acetona da *S. sclareoides* um novo lupeno triterpenotriol o qual foi identificado como (1 β ,3 β)-lup-20(29)-ene-1,3,30-triol (**19**) (Figura 1.5). Foram também identificados os seguintes compostos: nepetidina (**20**), nepeticina (**21**), lupendiol (**22**), (1 β ,11 α)-dihidroxi-lup-20(29)-en-3-ona (**23**), ácido ursólico (**24**), ácido sumaresinolico (**25**), hederagenina (**26**) (Rauter et al., 2007). Na mesma espécie de *Salvia* foram também identificados os flavonóides catequina, campferol glicolizado e quercetina. Os extratos preparados revelaram ainda a presença de ácidos fenólicos, sendo o ácido vanílico (**6**) o composto maioritário.

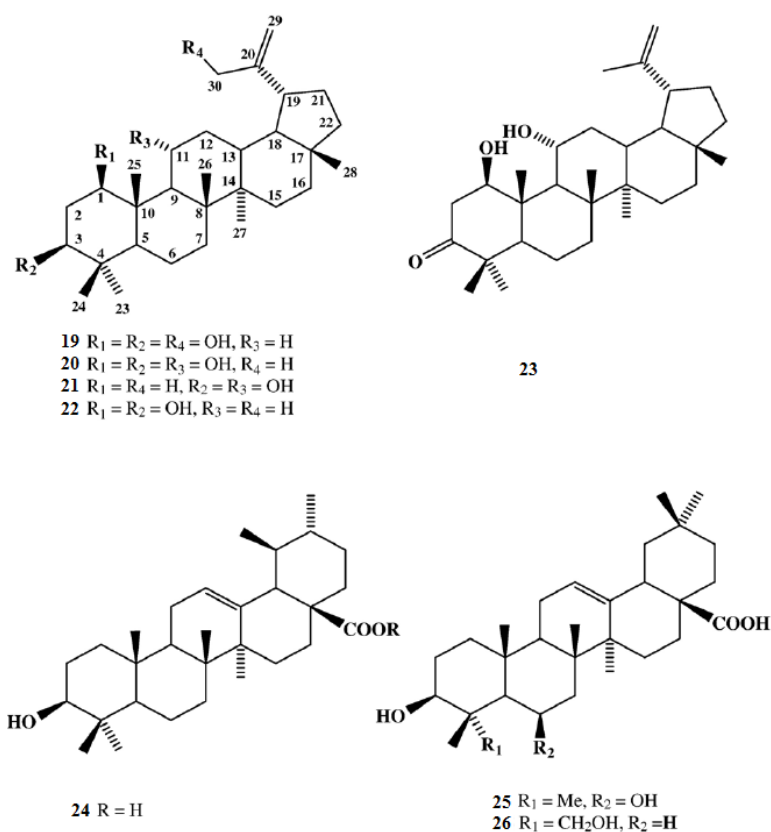


Figura 1.5- Estrutura dos compostos isolados da *S. sclareoides* (Rauter et al., 2007).

Posteriormente, Rauter et al. (2012) publicaram um estudo que envolveu a preparação de extratos de *S. sclareoides*, em vários solventes, que foram avaliados quanto ao conteúdo fenólico e perfil químico, para além da atividade antioxidante, toxicidade aguda e genotoxicidade. O extrato em butanol foi o que apresentou o maior conteúdo fenólico e atividade antioxidante (DPPH), revelando a presença dos flavonóides catequina, campferol e quercetina. O ácido vanílico foi o principal componente de todos os extratos, no entanto, o ácido gálico, gentísico, cafeico, siríngico, cumárico e ferúlico foram também encontrados em alguns dos extratos.

1.3. Atividades biológicas em espécies de *Salvia*

As espécies de *Salvia* são uma fonte natural de compostos antioxidantes e, por isso, têm sido alvo de inúmeros estudos científicos no sentido de identificar e isolar os constituintes responsáveis por esta e

outras atividades biológicas, muito em particular, o seu papel na prevenção e tratamento de doenças neurodegenerativas.

1.3.1. Atividade antioxidante

Define-se como antioxidante qualquer substância que, quando presente em pequenas concentrações relativamente a um substrato oxidável, inibe e previne significativamente a oxidação desse substrato. O termo substrato oxidável refere-se a qualquer molécula orgânica encontrada *in vivo* (Halliwell, 2007).

Em organismos aeróbios, os radicais livres são constantemente produzidos durante o funcionamento normal da célula, geralmente sob a forma de espécies reativas de oxigénio (ROS). Quando produzidos, a maior parte dos radicais livres são removidos pelas defesas antioxidantes da célula que incluem enzimas e moléculas não enzimáticas. A manutenção do equilíbrio entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes é uma condição essencial para o funcionamento normal do organismo. Sempre que este equilíbrio é perturbado, estamos perante uma situação de stress oxidativo onde as ROS em excesso podem oxidar e danificar lípidos celulares, proteínas e DNA, levando à sua modificação e, frequentemente, à sua inutilização, inibindo a sua função normal (Ferreira e Abreu, 2007).

O stress oxidativo é um fenómeno associado ao aparecimento de muitas doenças que incluem vários tipos de cancro, diabetes, cirrose, doenças cardiovasculares, declínio cognitivo e perda neuronal associada à idade em doenças neurodegenerativas. As células neuronais, que sofrem perda funcional (ataxia) e sensorial (demência) em doenças neurodegenerativas, estão mais suscetíveis a danos oxidativos quando comparadas com outros tecidos. O cérebro é muito sensível ao stress oxidativo por ser rico em ácidos gordos peroxidáveis e possuir escassos mecanismos antioxidantes (Vladimir-Knežević et al., 2014). Assim, os antioxidantes assumem um papel importante no tratamento destas patologias, capturam radicais livres e contribuem para a diminuição dos danos provocados pelo stress oxidativo.

O reino vegetal oferece uma ampla gama de compostos com ação antioxidante e, por isso, muitos grupos de investigação dedicam-se ao estudo de extratos vegetais, conseguindo identificar e isolar os compostos maioritários. Estes estudos demonstraram a existência de uma forte correlação entre a atividade antioxidante e o conteúdo em compostos fenólicos presentes em alguns extratos (Kamatou et al., 2010). Existem evidências de uma correlação direta entre o stress oxidativo e o processo inflamatório. Compostos como os ácidos carnósido e ursólico, presentes em espécies de *Salvia*, e com elevado potencial antioxidante, demonstraram possuir também propriedades anti-inflamatórias. Kamatou et al. (2010), estudaram 16 espécies de *Salvia* e uma delas, *S. radula*, revelou atividade anti-inflamatória moderada ($IC_{50} = 78,8 \mu\text{g/mL}$).

1.3.2. Atividade anticolinesterásica

As espécies de *Salvia* são conhecidas por terem uma ação benéfica no tratamento da depressão, perda de memória, demência e isquemia cerebral, sendo a *S. officinalis*, *S. lavandulaefolia*, e a *S. miltiorrhiza* as espécies mais usadas para este efeito (Hamidpour et al., 2014).

A doença de Alzheimer é a forma mais comum de demência que provoca uma deterioração global, progressiva e irreversível de diversas funções cognitivas. Esta deterioração tem como consequências alterações no comportamento, na personalidade e na capacidade funcional da pessoa, dificultando a realização das suas atividades de vida diária. A doença de Alzheimer é patologicamente definida pela presença de placas amilóides, resultantes da deposição da proteína beta-amiloide, pela degenerescência neurofibrilar e por baixos níveis de acetilcolina no cérebro (Hamidpour et al., 2014).

A acetilcolinesterase (AChE) é a enzima responsável por hidrolisar o neurotransmissor acetilcolina (ACh) nas sinapses colinérgicas. Nestas sinapses a ACh atua transmitindo a mensagem de um neurónio a outro. As sinapses colinérgicas estão amplamente distribuídas no sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP), sendo importantes para a manutenção de inúmeras funções fisiológicas humanas. Assim, uma estratégia terapêutica para aumentar a neurotransmissão colinérgica é aumentar a disponibilidade de acetilcolina através da inibição da acetilcolinesterase (Araújo et al., 2016). Os extratos vegetais com ação anticolinesterásica têm sido estudados como alternativa aos fármacos atuais, que apenas retardam a progressão da doença e têm efeitos secundários adversos.

Segundo Hamidpour et al. (2014), o efeito neuroprotetor da *Salvia* pode estar relacionado com a presença do ácido rosmarínico que demonstrou ação neuroprotetora, antioxidante e anti-apoptótica contra a toxicidade da proteína beta-amiloide. As propriedades neuroprotetoras do ácido rosmarínico presente em extractos de *S.sclareoides* já haviam sido referidas por Marcelo et al. (2013) que, recorrendo a técnicas de NMR, verificaram a existência de interações entre este composto e a AChE.

Um estudo anterior (Rauter et al., 2007) revelou que os extratos desta planta em acetona, etanol, butanol e água inibem a atividade das enzimas acetil- e butirilcolinesterase a 10 µg/mL, uma atividade notável dado que a rivastigmina, medicamento administrado a doentes com Alzheimer, não inibe a acetilcolinesterase na mesma concentração.

Uma revisão extensiva do potencial de plantas do género *Salvia* para o tratamento e prevenção de desordens cognitivas foi recentemente publicada (Lopresti, 2017).

1.4. Produção de bolachas

1.4.1. Caracterização geral de bolachas

Uma bolacha pode ser definida como um produto de padaria preparado a partir de farinha de trigo, açúcar, gordura, leite em pó, sal, água e, em menor quantidade, bicarbonato de amónio, bicarbonato de sódio e emulsionantes que têm como função melhorar a cor, o sabor, a textura e a consistência do produto final (Manley, 1998).

As bolachas são um alimento básico de elevada aceitação e consumido por pessoas de todas as idades, em parte devido à enorme variedade existente. As diferenças sensoriais notórias, tais como o tamanho, a forma, a cor, o sabor, o aroma e a textura, são as que permitem mais rapidamente distingui-las (Cauvain e Young, 2006).

1.4.2. Principais ingredientes usados na preparação de bolachas

As características da massa da bolacha dependem da qualidade e quantidade dos ingredientes utilizados na formulação. Na preparação de bolachas são normalmente usados os seguintes ingredientes: farinha, gordura, açúcar, água, fermento e sal.

1.4.2.1. Farinha

A farinha é o produto resultante da moenda de grãos de um ou mais cereais, maduros, sãos, germinados e isentos de impurezas, bem como da sua mistura (Art. 2º da Portaria 254/2003).

Existem duas espécies de trigo, o trigo duro (*Triticum durum*), do qual se obtém a sêmola usada no fabrico de massas e o trigo mole (*Triticum aestivum*) que produz a farinha que é usada no fabrico do pão, bolos e bolachas (Manley, 2000).

A farinha de trigo é composta por amido (70-75%), proteínas (8%-11%), lípidos (2%) e também os polissacáridos: celulose, hemicelulose, arabinxilano e β -glucanas. Em menor quantidade, estão presentes mono-, di- e oligossacáridos (glucose, frutose, sacarose, rafinose e glucofrutanas). A farinha de trigo é, também, fonte de vitaminas (B1, B2 e B6), niacina, ácido pantoténico, tocoferol, ferro e zinco (Manley, 2000).

A capacidade que a farinha de trigo tem para formar uma massa deve-se à presença das proteínas do glúten. A viscosidade e elasticidade são propriedades naturais dos elementos proteicos do glúten, a gliadina e a glutenina. A gliadina (composta pelos aminoácidos sulfurados, cistina e cisteína) é uma proteína bastante extensível, mas pouco elástica, responsável pela ductilidade e coesividade, enquanto a glutenina é o polímero responsável pela elasticidade da estrutura. A complexa mistura dessas duas cadeias proteicas longas resulta na formação de uma massa com propriedades de coesão e viscoelasticidade, na qual o glúten retém a água nos interstícios das cadeias proteicas.

As propriedades plásticas e mecânicas da farinha têm importância no produto acabado, uma vez que contribuem para uma consistência ótima da massa, para uma retenção conveniente do gás de fermentação e ainda para manter firme a estrutura do produto cozido.

1.4.2.2. Gordura

De acordo com Manley (2000) a gordura tem um efeito lubrificante na massa da bolacha e contribui para a plasticidade da mesma. Funciona como agente de crescimento através da retenção do ar durante a cozedura, interage com os restantes ingredientes para desenvolver e moldar a textura do produto e melhora as características sensoriais (Manley, 2000).

Nas bolachas, a gordura é um componente com inúmeras aplicações nas várias etapas produtivas, como por exemplo na elaboração dos recheios, coberturas, sprays para pulverizar a superfície das bolachas e até mesmo como antiaderente às telas do forno.

De um modo geral, as gorduras usadas na produção de bolachas podem ser de origem animal (manteiga) ou de origem vegetal (creme vegetal e os óleos de girassol, palma, soja e milho).

No entanto, esta matéria-prima é bastante instável e sujeita a deterioração. A mais conhecida é a auto oxidação lipídica que ocorre quando as gorduras entram em contacto com o oxigénio atmosférico, alteração que confere um “sabor a ranço” ao produto. Atualmente é possível controlar este fenómeno através da otimização das condições de armazenamento da matéria-prima, das condições de produção, dos aditivos incluídos na formulação e das condições de conservação definidas para o produto final (Manley, 2000).

a) Margarina

A margarina é um produto obtido a partir de gorduras e óleos vegetais e ou animais, com um teor mínimo de matérias gordas de 80% e inferior a 90%, com consistências variáveis consoante o fim a que se

destinam (Portaria nº 1548/2002). A margarina não é mais do que uma emulsão cristalizada de uma fase aquosa e de uma fase gorda.

Por lei está estabelecido que uma margarina deve ter no mínimo 80% de gordura e no máximo 16% de água, contudo as técnicas atuais permitiram desenvolver produtos com menor teor de gordura chamados de cremes para barrar.

b) Óleo vegetal

Um óleo é definido como uma gordura líquida à temperatura de 20°C e à pressão atmosférica. Os óleos provenientes de frutos ou sementes oleaginosas adotam a designação de óleos vegetais (Decreto-Lei nº106/2005).

Por sua vez, os óleos alimentares resultam da mistura de dois ou mais óleos, refinados isoladamente ou em conjunto, à exceção do azeite (Decreto-Lei nº 106/2005). A mistura de diferentes tipos de óleos permite obter um produto final com características particulares, resultante da combinação das características específicas de cada um dos óleos incorporados na mistura. Este fator determina a gama alargada de óleos disponibilizados no mercado, proporcionando ao consumidor a possibilidade de optar pelo óleo que melhor se adequa às suas necessidades e preferências.

O óleo alimentar é essencialmente composto por triacilgliceróis. Em menor quantidade encontram-se os monoacilgliceróis, diacilgliceróis, ácidos gordos livres, fosfatidos, esteróis, vitaminas lipossolúveis, tocoferóis, pigmentos, ceras e álcoois gordos (Food fats and oils, 2016).

1.4.2.3. Açúcar

A sacarose é um dissacárido constituído pelos monómeros glucose e frutose. É o açúcar tipicamente usado na preparação de massas, proveniente da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) e da beterraba (*Beta vulgaris*). No entanto, outros tipos de açúcar podem ser usados tais como a glucose, dextrose, extrato de malte e mel. A adição de açúcar afeta a estrutura e o aroma do produto. Em quantidades exageradas, a sacarose atua como um agente de endurecimento cristalizando à medida que a bolacha arrefece, tornando o produto mais crocante. Por outro lado, em quantidades moderadas, a adição de sacarose resulta na obtenção de uma massa macia, devido à capacidade de retenção de água deste açúcar (Sumnu e Sahin, 2008).

Este ingrediente é também referido como antioxidante, pois contribui para um aumento do tempo de prateleira, retardando a rancidez da gordura.

Em termos de cor, os açúcares são responsáveis pelo tom castanho dourado, que se obtém pelas reações do açúcar com os aminoácidos (reações de Maillard) e pela caramelização.

1.4.2.4. Água

A água é um ingrediente essencial na preparação de massas, uma vez que é necessária para solubilizar os outros constituintes, hidratar proteínas e hidratos de carbono e desenvolver a rede formada pelo glúten (Sumnu e Sahin, 2008).

A adição de água na formulação reduz a viscosidade e aumenta a extensibilidade da massa. No entanto, se a proporção de água for muito baixa, a massa torna-se quebradiça, perde consistência e exhibe um efeito marcado de "crosta" devido à desidratação rápida da superfície. Por outro lado, um aumento na

quantidade de água pode levar à expansão longitudinal da massa resultando em bolachas de espessura reduzida (Sumnu e Sahin, 2008).

1.4.2.5. Fermento

Na preparação de bolachas é comum adicionar fermento químico em pó que consiste numa mistura de um ácido fraco (ou um sal ácido) com bicarbonato de sódio (NaHCO_3). Quando esta mistura se dissolve em água, a uma temperatura elevada, liberta-se CO_2 que, por sua vez, promove o aumento do volume da massa. Os ácidos vulgarmente usados nestas preparações são o ácido tartárico, hidrogeno-tartarato de potássio, pirofosfato de sódio e fosfato de cálcio (Czernohorsky e Hooker, 2017).

1.4.2.6. Sal

O sal (NaCl) é muitas vezes usado, em pequena quantidade, na preparação de bolachas conferindo-lhes sabor. O sal também endurece o glúten e, portanto, reduz a viscosidade da massa (Sumnu e Sahin, 2008).

1.4.3. Caracterização física das bolachas

1.4.3.1. Textura

A textura de um alimento resulta de um grupo de propriedades físicas que se refletem ao nível da sua apreciação sensorial (visão, audição e tato), que refletem a estrutura interna do material, a qual depende da composição química e das interações moleculares dos seus constituintes. A textura é considerada como um dos atributos sensoriais mais importantes na aceitação das bolachas. É um fator determinante na qualidade dos produtos, uma vez que afeta a aceitação do consumidor e respetiva comercialização (Pereira et al., 2013).

A textura dos alimentos pode ser avaliada por métodos sensoriais ou instrumentais. Os métodos sensoriais recorrem a um painel de provadores devidamente treinados. Os métodos instrumentais são menos dispendiosos e mais rápidos em comparação com os métodos sensoriais. Existem vários métodos instrumentais para determinar a textura dos alimentos (Sumnu e Sahin, 2008).

As técnicas instrumentais usadas na medição da textura dos alimentos estão classificadas em três grupos: ensaios empíricos, que medem alguma propriedade física sob condições bem definidas; ensaios imitativos que simulam as condições em que o material é submetido na boca; ensaios fundamentais, que medem propriedades reológicas bem definidas tais como a viscosidade ou o módulo de elasticidade.

Na análise de textura usa-se um texturómetro (Figura 1.6). O seu princípio de funcionamento é provocar o contacto da amostra com uma sonda que, ao imprimir determinada força, provoca uma deformação no material. O grau de deformação da amostra, e a resistência oferecida, é registada e usada como um índice de textura do alimento.

O equipamento é constituído por um dinamómetro que fornece energia mecânica a velocidade constante. Contém um braço comandado por computador que se move na vertical, com uma dada velocidade, uma determinada distância e com um determinado tipo de sonda.

Os valores obtidos durante o deslocamento da sonda em contacto com a amostra são registados, de onde se obtém um gráfico de força *versus* tempo ou distância (texturograma) que permite avaliar a textura dos alimentos quer sob compressão quer sob penetração ou tração.

Os testes efetuados com o texturómetro são testes empíricos, sendo por isso muito dependentes das condições experimentais. Dependem da geometria da amostra (tamanho e forma), do tipo de sonda e de outras condições (velocidade, % deformação, entre outras). Os resultados apenas são comparáveis em condições exatamente iguais.



Figura 1.6- Texturómetro, durante um ensaio de textura.

1.4.3.2. Avaliação instrumental da cor

A cor é um dos atributos de qualidade mais importantes nos alimentos. Embora não reflita necessariamente o seu valor nutricional ou o sabor, determina a aceitabilidade de um produto pelos consumidores.

Em alguns casos, a avaliação instrumental da cor pode ser usada como um meio indireto de analisar um determinado componente ao qual está associada uma cor num alimento, uma vez que é mais simples e rápido do que a análise química. Pode ser desejável seguir as mudanças na cor de um produto durante o armazenamento, amadurecimento, processamento, e assim por diante. A cor é frequentemente usada para determinar o amadurecimento das frutas. A cor das batatas fritas, por exemplo, é amplamente controlada pelo teor de açúcares redutores, condições de armazenamento e posterior processamento (Sahin e Sumnu, 2005).

Na avaliação instrumental da cor usa-se um colorímetro acoplado a uma fonte de iluminação padrão, cujos resultados são dados em função do sistema CIE $L^*a^*b^*$ (CIE do francês “*Commission internationale de l’éclairage*”). Através deste, a cor é localizada no espaço e determinada pelas coordenadas retangulares: L^* , a^* e b^* (Figura 1.7). A coordenada L^* , luminosidade, representa a diferença entre o branco ($L^*=100$) e preto ($L^*=0$). As coordenadas de cromaticidade a^* e b^* representam, respetivamente, a diferença entre o verde ($-a^*$) e o vermelho ($+a^*$) e a diferença entre o azul ($-b^*$) e o amarelo ($+b^*$) (Sahin e Sumnu, 2005).

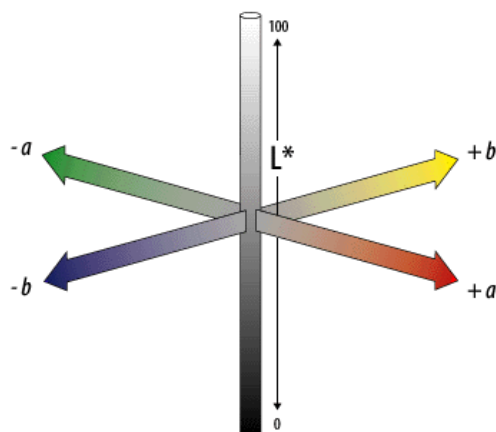


Figura 1.7- Espaço de cor L*, a*, b*.

Além destas, existem as coordenadas cilíndricas, h° (*Hue-Angle*) que corresponde ao ângulo da tonalidade e C^* (*Chroma*) que define a saturação. O valor de saturação C^* , representa a distância do eixo de luminosidade (L^*) e inicia-se em zero, no centro. O ângulo de tonalidade, expressa-se em graus, começa no eixo $+a^*$ e movimenta-se no sentido anti-horário (Figura 1.8).

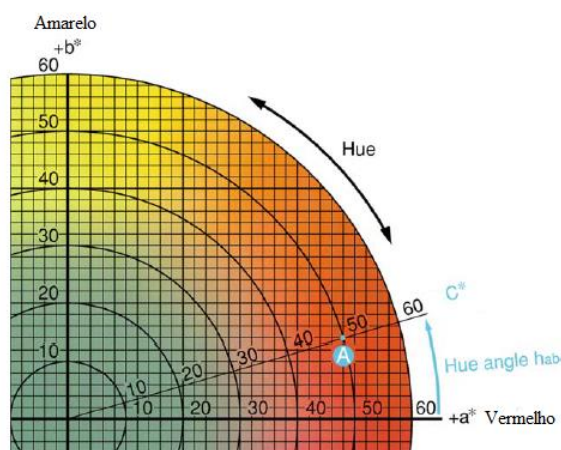


Figura 1.8- Porção do diagrama de cromaticidade a^* , b^* onde é possível observar a posição de A que corresponde à cor vermelha de uma maçã (Nielzen, 2009).

1.4.3.3. Atividade da água

Em todos os alimentos que contêm água, em maior ou menor proporção, a deterioração pode acontecer de forma rápida, devido a reações enzimáticas e químicas que ocorrem durante o armazenamento. Por este motivo é importante saber qual o teor de água presente no alimento (humidade), uma vez que este é um fator importante no controlo da taxa de deterioração. Nos produtos alimentares, a água pode ser encontrada de três formas diferentes: água de hidratação (água que está quimicamente ligada), água livre (encontra-se retida fisicamente nos poros do alimento, funciona como agente dispersante para substâncias coloidais e como solvente de sais) e água adsorvida (retida nas paredes celulares ou no protoplasma, associada a proteínas) (Nielsen, 2009).

A propriedade mais importante relativa à água em alimentos é a atividade da água (a_w), a qual é definida como a relação da pressão de vapor de água em equilíbrio com um alimento e a pressão de saturação de vapor à mesma temperatura (Nielsen, 2009). A relação que permite o cálculo da a_w é a seguinte:

$$a_w = \frac{P}{P_0} \quad (1.1)$$

Onde a_w é a atividade da água; P a pressão de vapor de água sobre o produto; P_0 a pressão de vapor de água saturado à mesma temperatura.

O valor da a_w encontra-se compreendido entre zero (quando a água na sua forma livre é inexistente) e um (quando a água se encontra totalmente disponível, o equivalente à água pura).

A a_w permite prever a estabilidade do produto, não só no que diz respeito ao crescimento microbiano, mas também da velocidade das reações químicas e bioquímicas e das propriedades físicas. De uma forma geral, quanto maior for o teor de humidade maior é o valor de a_w e consequentemente maior é a sensibilidade do produto à deterioração (Manley, 2000; Rahman, 2007).

1.4.4. Declaração nutricional

O rótulo de um produto, para além da função publicitária, deve ser fundamentalmente um meio de informação que permita ao consumidor uma escolha adequada e uma atuação correta na conservação e consumo do produto. Assim, as indicações devem ser esclarecedoras quanto à composição, qualidade, quantidade, validade ou demais características que entrem na composição do produto. É por isso importante realizar análises nutricionais aos alimentos.

De acordo com o Regulamento (EU) N° 1169/2011 a declaração nutricional deve incluir os seguintes parâmetros (expressos em g/100 g de porção edível): lípidos, ácidos gordos saturados, hidratos de carbono, açúcares, proteínas e sal, para além do valor energético (expresso em kcal e kJ/100 g). O conteúdo da declaração nutricional pode ainda ser complementado pela indicação das quantidades de um ou mais dos seguintes elementos: ácidos gordos monoinsaturados, ácidos gordos polinsaturados, polióis, amido, fibra e vitaminas ou sais minerais.

A apresentação da declaração nutricional obedece a padrões e por isso as informações nutricionais devem encontrar-se agrupadas, sob a forma de quadro. Os caracteres devem ser legíveis e indeléveis e devem ser colocados em local bem visível. O valor energético é calculado, utilizando-se os coeficientes de conversão (4 kcal/g para proteínas e hidratos de carbono; 9 kcal/g para a matéria gorda), de acordo com o recomendado pelo Regulamento (EU) N° 1169/2011.

Capítulo II

Materiais e Métodos

2. Materiais e métodos

Neste capítulo será apresentado o trabalho experimental, descrevendo-se os materiais e os métodos utilizados.

2.1. Materiais

2.1.1. Material vegetal

A planta *Salvia sclareoides* foi fornecida pela empresa ERVITAL (Mezio, Castro Daire, Portugal). No presente trabalho utilizou-se toda a parte aérea seca da planta, a qual foi previamente fragmentada e pulverizada para posteriores incorporações e extrações.

2.1.2. Ingredientes utilizados na preparação das bolachas

No fabrico de bolachas doces e salgadas foram utilizados os seguintes ingredientes: farinha de trigo para bolos (Nacional); farinha de trigo sem fermento, tipo 55 (Espiga); açúcar branco de cana (Sidul); creme vegetal (Vaqueiro); fermento em pó para bolos (Pingo Doce); óleo vegetal (Fula); sal refinado; água destilada.

2.1.3. Reagentes, solventes, consumíveis diversos

Salvo indicação em contrário, os reagentes e solventes utilizados ao longo dos vários procedimentos experimentais foram de qualidade *p.a.*

Para a extração do material vegetal e bolachas foi usado etanol a 70% (v/v) (Carlo Erba) e água ultrapura, obtida a partir de um sistema de filtração Milli-Q (Millipore).

Para a análise nutricional das bolachas foram usados os seguintes reagentes: ácido clorídrico (Sigma-Aldrich), éter de petróleo 40-60°, ácido sulfúrico 98% (Merck), ácido sulfúrico 0,05 M (Tritipur®, Merck), catalisador Kjeldahl em pastilhas com 9% de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Panreac Applichem), cloreto de sódio 99,5% (Fluka), ferrocianeto de potássio 15% (p/v), acetato de zinco 30% (p/v), alúmen de ferro (III) (Riedel-de-Haën), ácido nítrico 65% (Chem-Lab), tiocianato de potássio 0,1M (Panreac Applichem), nitrato de prata 0,1 M (Tritipur®, Merck), sulfato de sódio anidro (Merck), *n*-heptano (Merck), hidróxido de potássio 2,0 M (Merck), Acetona (Merck), tampão fosfato 0,008 M e etanol absoluto 99,8 % (Sigma-Aldrich).

Para determinação da fibra dietética total utilizou-se um *Kit* de ensaio (Merck) contendo α -amilase, amido-glucosidase, protease e Celite.

Na análise dos ácidos gordos por cromatografia gasosa usaram-se padrões da Supelco® (Supelco® 37 FAME Mix C4:0-C24:0) e da GLC 674 da Nu-Chek-Prep (Elysian).

Na análise dos extratos por cromatografia de alta eficiência usaram-se solventes de qualidade HPLC (Carlo Erba) e padrões de elevado grau de pureza (Extrasynthèse e Sigma-Aldrich).

Na determinação dos fenóis totais foi usado o reagente de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich), ácido gálico monohidratado 98% (Sigma-Aldrich) e carbonato de sódio 99,5% (Panreac Applichem).

Na determinação da atividade antioxidante dos extratos foi usado o DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo) (Sigma-Aldrich) e metanol (Carlo Erba).

Para o estudo da actividade anti-inflamatória foram adquiridos ácido acetilsalicílico e albumina de soro bovina (Sigma-Aldrich).

Os reagentes usados na avaliação da atividade anticolinesterásica dos extratos foram adquiridos à Sigma-Aldrich: Enzima acetilcolinesterase (AChE) tipo VI-S, extraída de *Electrophorus electricus* (pó liofilizado contendo 200-1,000 unidades/mg proteína), iodeto de acetiltiocolina (AChI), 5,5'-Ditiobis [2-nitrobenzoato] (DTNB), tampão ácido 4-(2-hidroxi etil)-1-piperazinoetanossulfónico (HEPES). Usou-se ainda cloreto de sódio e cloreto de magnésio (Panreac-Applichem).

Nos ensaios de citotoxicidade *in vitro* foi usado meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado com antibióticos (Celbio s.r.l., Itália). O MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) foi adquirido à Sigma-Aldrich (Itália). Foram usados consumíveis diversos para a cultura celular (Corning, USA) e microplacas de 96 poços (PerkinElmer Life Sciences, USA).

2.1.4. Equipamento

Na trituração do material vegetal usou-se o moinho com rotor de velocidade variável (Pulverisette 14 Premium line, Fritsch) equipado com dois crivos (2,0 mm e 0,12 mm).

Na trituração e homogeneização das bolachas para análise, usou-se um moinho de “café” (Modelo 8115, SEB®).

Para a preparação de extratos utilizaram-se extratores Soxhlet de 1000 mL e de 125 mL, com as respectivas mantas de aquecimento, tendo as amostras de granulometria mais fina sido colocadas em cartuchos de extração de celulose (33 mm × 100 mm). Para a extração a frio, usou-se uma tina de vidro retangular de 2000 mL. Os extratos foram evaporados à secura, a pressão reduzida e baixa temperatura (40 °C), em evaporador rotativo Buchi R-210. A liofilização do extrato aquoso foi efetuada num liofilizador HetoPower Dry 3000.

No estudo de absorção de água e óleo pelo material vegetal seco pulverizado usou-se um banho com agitação (Kottermann Labortechnik, Germany) e uma centrifugadora (Hermle Z; 383 K).

Para a produção das bolachas foi necessário o seguinte equipamento: balança (Precisa Instruments/Switzerland) (Max = 1100 g; d = 0,1 g); robot de cozinha (Bimby, Vorwerk); cortador metálico redondo, com diâmetro de 4,65 cm e área de 16,98 cm²; cortador metálico quadrado, com área de 31,36 cm²; rolo de massa em inox; duas régua em acrílico com 2 mm de espessura; forno elétrico (ARIANA, UNOX®); estufa para panificação (ARIANA, UNOX®); laminadora de massa em inox (Atlas Wellness 150, Marcato).

Na análise dos parâmetros físicos das bolachas foi necessário recorrer aos seguintes equipamentos: Balança TB-110 (Denver Instrument Company, Max = 110 g; d = 0,0001 g); balança Nahita, (Max = 500 g; d = 0,01 g); colorímetro, CR-400, com prato de calibração (Konica Minolta); paquímetro digital

(Powerfix®); estufa (Binder); texturômetro TA-TXPlus (Stable Micro Systems); sonda cilíndrica com 2 mm de diâmetro e sonda HDP/BSG (blade set with guillotine); medidor de a_w , Hygropalm (Rotronic, UK).

Para a análise nutricional das bolachas utilizou-se o seguinte equipamento: balança Mettler Toledo P-204 (Max = 220 g; d = 0,0001 g); placa de aquecimento com agitação (VWR); mufla (Heraeus – Thermo Scientific (0-100 °C)); estufa (Memmert); digestor automático; unidade de destilação automática (Kjeltec™ 8200, FOSS); titulador automático (808 Tritrindo, Metrohm); extrator Soxhlet automático (Soxtec™ 2050, FOSS); módulo de filtração a vácuo para determinação quantitativa da fibra dietética (Fibertec™ 1023, FOSS); cadinhos para determinação da fibra (P2 (40 - 100 µm), FOSS).

Para a análise dos ácidos gordos usou-se um cromatógrafo gasoso (Agilent 6890N, Network) equipado com um injetor automático (7683B, Agilent Technologies, Atlanta, GA, USA) e um detetor de ionização de chama (FID). Os compostos foram separados numa coluna capilar com 100 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,20 µm de espessura de película (Supelco® 2560). O hélio foi usado como gás de arraste.

Na caracterização do perfil fenólico dos extratos usou-se o equipamento de HPLC-DAD (Agilent 1100 Series LC system, Germany), constituído pelos seguintes módulos: desgaseificador de vácuo (G1322A), bomba quaternária (G1311A), amostrador automático (G1313A), termostato de compartimento da coluna (G1316A) e um detetor de díodos (G1315B). As análises foram realizadas numa coluna Mediterranea Sea 18, 15 × 0.21 cm de diâmetro interno, com partículas de 5 µm (Teknokroma, Espanha). A aquisição de dados e o controle instrumental foram realizados pelo software LC3D ChemStation (versão Rev.A.10.02 [1757], Agilent Technologies).

Para a determinação do teor de fenóis totais e das atividades antioxidante e anti-inflamatória, as leituras de absorvância foram efetuadas no espectrofotómetro de UV-Vis. (Spectroquant Pharo 100, Merck). Para a avaliação da atividade anticolinesterásica recorreu-se a um espectrofotómetro UV-160 (UV-Vis.), Shimadzu.

Nos ensaios de citotoxicidade, e de forma a prevenir eventuais contaminações, todo o trabalho com linhas celulares foi executado em câmara de fluxo laminar. As células foram incubadas em estufa, com atmosfera de CO₂ controlada. A confluência e vitalidade celulares foram controladas através da observação em microscópio invertido e o n° de células viáveis determinado com a ajuda de um contador automático. As leituras de absorvância foram efetuadas no leitor de microplacas Victor3 (PerkinElmer Life Sciences).

2.2. Métodos

2.2.1. Confeção das bolachas

2.2.1.1. Preparação do material vegetal

O material vegetal seco (1000 g) foi previamente triturado para redução do tamanho de partícula e homogeneização. Para isso, fez-se uma primeira trituração num robot de cozinha, em porções de 30 g, durante 10 segundos. Em seguida, usou-se o moinho Fritsch, (Figura 2.1), para triturar todo o material vegetal com granulometria máxima de 2,0 mm. Deste, retirou-se cerca de metade (500 g) para nova moagem, utilizando um crivo de 0,12 mm, obtendo-se um pó fino semelhante a uma farinha, o qual foi posteriormente armazenado em frascos de vidro estanques, protegidos da luz.



Figura 2.1- Moinho de rotor com velocidade variável, Fritsch (d); Visualização do material vegetal após a pulverização, crivo de 2,0 mm (e) e crivo de 0,12 mm (f).

2.2.1.2. Preparação das bolachas

a) Bolachas doces

A incorporação de *S. sclareoides* em bolachas doces envolveu a preparação de massas contendo 2% e 5% da planta com as granulometrias de 0,12 e 2,0 mm. A massa designada por controlo contém todos os ingredientes (farinha, creme vegetal, açúcar, fermento e água), com a exceção da *S. sclareoides*.

Para a preparação das massas, os ingredientes foram pesados numa balança de precisão e misturados no robot de cozinha com velocidade 4, durante 20 segundos. Posteriormente, a massa obtida foi colocada em cima de uma bancada onde foi estendida com um rolo de massa e duas réguas com 2 mm de espessura. Com uma forma de corte redonda em alumínio, as bolachas foram cortadas e distribuídas em tabuleiros para serem cozidas no forno elétrico ventilado, a 110 °C, durante 40 minutos. De seguida, efetuou-se o arrefecimento das bolachas, durante 30 minutos, até à temperatura ambiente (cerca de 25 °C), para posterior análise. Por fim, as bolachas foram armazenadas em frascos de vidro estanques, à temperatura ambiente. Todo o processo de produção está representado no fluxograma da Figura 2.2.

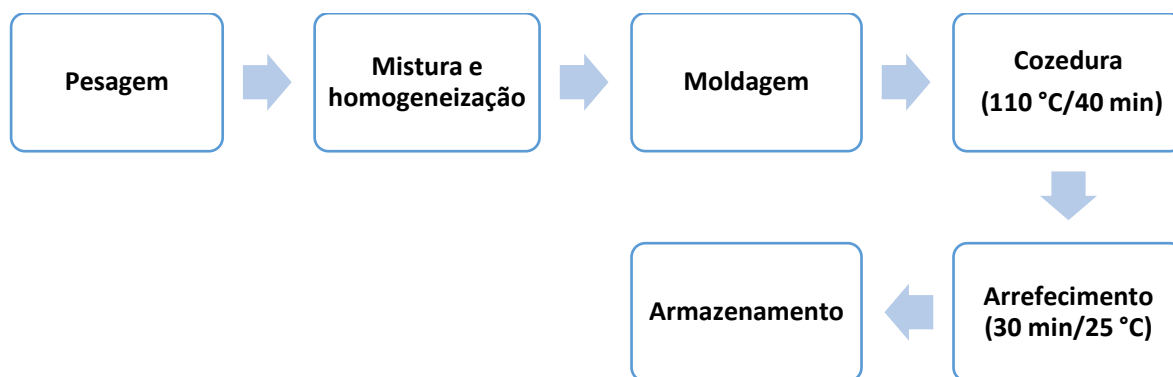


Figura 2.2- Fluxograma do processo de produção das bolachas doces com *S. sclareoides* incorporada.

b) Bolachas salgadas

Para incorporação da *S. sclareoides* em bolachas salgadas foram preparadas massas contendo 2% e 5% da planta com as granulometrias de 0,12 e 2,0 mm. A massa designada por controlo contém todos os ingredientes (farinha, fermento, açúcar, sal, água e óleo), com a exceção da *Salvia*.

Para a preparação das massas, os ingredientes foram pesados e, posteriormente, misturados num robot de cozinha, em velocidade 4, durante 1 minuto. A massa obtida foi estendida com a ajuda de uma laminadora. Com uma forma de corte quadrada, em alumínio, cortaram-se as bolachas que, em seguida, foram colocadas em tabuleiros forrados com papel vegetal. Em cada bolacha foram feitos 8 furos com um garfo. Depois de a massa descansar 10 minutos, foram cozidas em forno elétrico ventilado, a 180 °C, durante 10 minutos. De seguida, efetuou-se a secagem das bolachas numa estufa a 60 °C, durante 30 minutos. Por fim, as bolachas foram retiradas da estufa e arrefeceram por mais 30 minutos, sendo posteriormente armazenadas em frascos de vidro, à temperatura ambiente. Todo o processo de produção está representado no fluxograma da Figura 2.3.

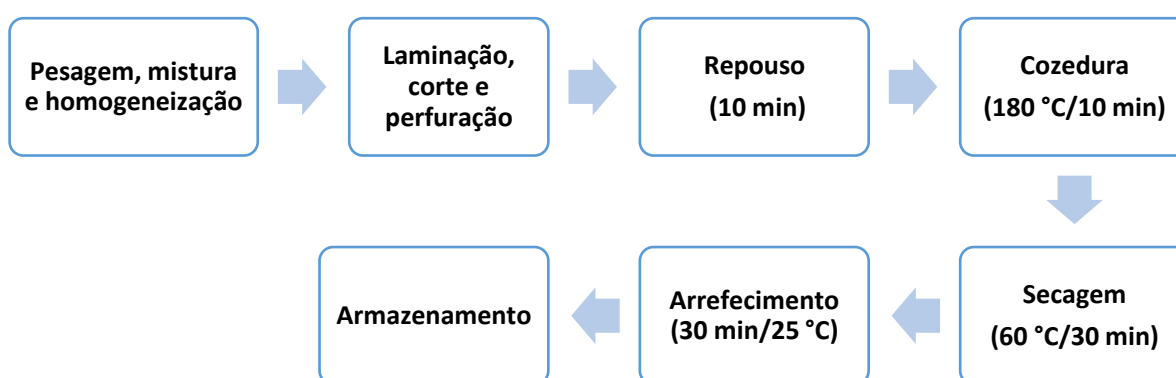


Figura 2.3- Fluxograma do processo de produção das bolachas salgadas com *S. sclareoides* incorporada.

2.2.1.3. Análises físicas das bolachas

Antes de serem realizadas as análises físicas das bolachas foi feito um estudo preliminar sobre a capacidade de absorção de água e óleo pelo material vegetal seco que foi incorporado nas bolachas. Pretende-se que este estudo possa ajudar a interpretar os resultados obtidos.

Nas análises físicas das bolachas foram determinados os seguintes parâmetros: cor, dimensões, textura e atividade da água (a_w).

2.2.1.3.1. Índice de absorção de água e Capacidade de absorção de óleo das amostras pulverizadas de *S. sclareoides*

As amostras pulverizadas de *S. sclareoides*, com as duas granulometrias (0,12 e 2,0 mm), foram caracterizadas em termos de absorção de água e de óleo.

Para determinar a capacidade de absorção de água seguiu-se a metodologia descrita por Leach, McCowen & Schoch (1959).

Em três tubos de centrífuga, previamente pesados, foi colocado pó de *Salvia* com granulometria 0,12 mm (0,5 g), e água destilada (6 mL). Os tubos contendo as amostras foram agitados no Vortex e colocados num banho de água com agitação, a 20 °C, durante 30 minutos. Após centrifugação, a 10000 g, durante 10 minutos, os respectivos sobrenadantes foram colocados em placas de Petri e secos na estufa, a 109,5 °C, até peso constante. O mesmo procedimento foi aplicado ao pó de *Salvia* com granulometria de 2 mm. O índice de absorção de água (IAA) foi calculado através da seguinte expressão:

$$IAA (g/g) = \frac{m(\text{sedimento})}{m(\text{amostra}) - m(\text{resíduo após evaporação})} \quad (2.1)$$

A capacidade de absorção de óleo foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Kaushal et al. (2012). Em três tubos de centrífuga, previamente pesados, foi colocado pó de *S. sclareoides* com granulometria 0,12 mm (0,5 g) e óleo de milho (6 g). Os tubos contendo as amostras foram agitados no Vortex e colocados num banho de água com agitação, a 20 °C, durante 1 h. Após 30 minutos de descanso, as amostras foram centrifugadas, a 10 000 g, durante 35 minutos. O óleo foi removido com uma pipeta e os tubos foram invertidos, durante 25 minutos, para escorrer o restante óleo. Por fim, foram pesados (m_{final}) e determinou-se a capacidade de absorção de óleo (OAC) através da seguinte expressão:

$$OAC (g/g) = \frac{m_{final} - (\text{massa tubo vazio} + \text{massa de amostra})}{\text{massa de amostra}} \quad (2.2)$$

O mesmo procedimento foi aplicado ao material vegetal com granulometria de 2,0 mm. As determinações foram feitas em triplicado e calculado o respectivo desvio padrão.

2.2.1.3.2. Avaliação instrumental da cor

A análise da cor foi efetuada diretamente sobre a superfície das massas crua e cozida de cada formulação, utilizando-se o colorímetro, com o iluminante padrão D₆₅ e um ângulo visual de 2°. Os resultados foram expressos de acordo com o sistema CIE L*a*b*.

Foram realizadas 6 medições para cada amostra, sob luz artificial constante, à temperatura ambiente.

O parâmetro C* (*Chroma*) que define a intensidade da cor foi calculado a partir da equação 2.3:

$$C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad (2.3)$$

O parâmetro de cor h° (*Hue-Angle*), que mede a tonalidade, foi calculado a partir da seguinte equação:

$$h^{\circ} = \tan^{-1} \left(\frac{b^*}{a^*} \right) \quad (2.4)$$

A diferença total de cor (ΔE^*) foi calculada a partir da equação 2.5, nas seguintes situações: entre as massas cruas e as bolachas, entre bolachas com 2% e 5% de *S. sclareoides* com a mesma granulometria, e entre bolachas com a mesma concentração de *S. sclareoides* e granulometria diferente.

$$\Delta E^* = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2} \quad (2.5)$$

2.2.1.3.3. Determinação das dimensões

Para avaliar as dimensões das bolachas doces, foram determinados a espessura e o diâmetro, com o auxílio de um paquímetro digital, com o objetivo de calcular o *spread ratio* (razão entre o diâmetro e a espessura) (Fradinho et al., 2015). Foram realizadas seis medições para cada formulação.

No caso das bolachas salgadas, sendo elas quadradas, foram determinados a espessura e o comprimento médio dos lados da bolacha.

2.2.1.3.4. Análise de textura

Na realização da análise de textura foram feitos testes em modo de penetração, usando o texturómetro com uma sonda cilíndrica de 2 mm de diâmetro, a uma velocidade de 0,5 mm/s. Com o mesmo equipamento realizaram-se também testes de “*snap*” ou “*three point bending*” com uma sonda (HDP/BSG), a uma velocidade de 3 mm/s. Foram obtidos texturogramas de força *versus* tempo a partir do qual se determinou a dureza (N). Os testes realizaram-se à temperatura ambiente (T=20±1 °C).

2.2.1.3.5. Análise da atividade da água (a_w)

As bolachas foram previamente trituradas e as medições efetuadas através do equipamento HygroPalm a temperatura constante (20,0±0,1 °C). Foram realizadas medições em triplicado para cada formulação e calculados os valores médios com o respetivo desvio padrão.

2.2.1.4. Análise nutricional das bolachas

Para análise nutricional das bolachas foram selecionadas as formulações com 2% e 5% de *S. slacreoides* de granulometria 2,0 mm e os respectivos controlos. Todas as amostras foram previamente homogeneizadas num moinho de “café” para se determinarem os seguintes parâmetros: teor de humidade, cinza, proteína, gordura total, fibra alimentar e sal. Os hidratos de carbono disponíveis e o valor energético foram obtidos por cálculo.

As análises foram realizadas em duplicado e calculados os valores médios com o respetivo desvio padrão.

2.2.1.4.1. Determinação da humidade

Para a determinação do teor de humidade utilizou-se o método 952.08 da AOAC (2000).

As determinações foram efetuadas por gravimetria, após secagem em estufa, a 130 °C, durante, aproximadamente, 4 horas, seguido de um arrefecimento em exsiccador por 30 minutos. A quantidade de amostra analisada foi de, aproximadamente, 4,01 g e a percentagem de humidade na amostra foi calculada através da seguinte equação:

$$\% \text{ Humidade} = \frac{\text{massa de amostra húmida} - \text{massa de amostra seca}}{\text{massa de amostra húmida}} \times 100\% \quad (2.6)$$

2.2.1.4.2. Determinação das proteínas

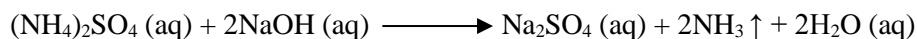
Na determinação da proteína total seguiu-se o método de Kjeldahl descrito pela AOAC 991.20.

O método de Kjeldahl foi desenvolvido em 1883 pelo químico dinamarquês Johan Kjeldahl para determinar o teor de proteína na cerveja. Atualmente, com algumas adaptações, é um método muito usado na determinação do teor de azoto em diversos alimentos, que, multiplicado por um fator de conversão, quantifica a proteína total na amostra (Sáez-Plaza *et al.*, 2013).

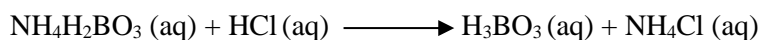
A primeira etapa do método de Kjeldahl envolve a digestão da amostra com ácido sulfúrico a quente, na presença de um catalisador (mercúrio, cobre ou selénio) e sulfato de potássio:



A adição de hidróxido de sódio em excesso promove a formação de amónia que é destilada e recolhida numa solução de ácido bórico:



Por último, o destilado é titulado com uma solução de ácido clorídrico:



O teor de proteína total, expresso em gramas de proteína por gramas de amostra, foi calculado através da equação:

$$Proteína\ total = \frac{0,14 \times (V_1 - V_0)}{m} \times 5.70 \quad (2.7)$$

Onde V_1 é o volume (mL) de solução de ácido gasto na titulação de amostra; V_2 , o volume (mL) de ácido gasto na titulação do branco da destilação; m , a toma de amostra (g) sendo que, **5,70** corresponde ao fator de conversão azoto (Greenfield e Southgate, 2003).

2.2.1.4.3. Determinação da gordura total

A determinação da gordura total foi realizada de acordo com o método da hidrólise ácida, segundo o AOAC 948.15 (2000).

Este procedimento baseia-se na hidrólise das ligações entre lípidos, proteínas e hidratos de carbono através do tratamento da amostra com ácido clorídrico, seguido de uma filtração e extração da gordura com um solvente apolar. Por último, o solvente é eliminado por evaporação e o resíduo obtido é seco e pesado.

O teor de matéria gorda total (C_{mg}), expressa em gramas por 100 gramas de amostra, foi calculada através da seguinte expressão:

$$C_{mg} = \frac{m_2 - m_1}{m_0} \times 100 \quad (2.8)$$

Onde, m_0 é a massa de amostra (g); m_1 a massa do copo (g); m_2 a massa do copo com a gordura extraída (g), após peso constante.

2.2.1.4.4. Determinação das cinzas

Para a determinação das cinzas totais seguiu-se a metodologia descrita por Albuquerque et al. (2016) baseada no método de referência da AOAC 932.03.

A cinza, expressa em gramas por 100 gramas de amostra, foi calculada através da seguinte expressão:

$$Cinza\ total = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \times 100\% \quad (2.9)$$

Onde, m_0 é a massa do cadinho (g), previamente seco em estufa a 100 °C, e arrefecido no exsiccador; m_1 a massa do cadinho com a amostra (g); m_2 a massa do cadinho com a amostra incinerada (g), após peso constante.

2.2.1.4.5. Determinação da fibra alimentar

A determinação da fibra total foi realizada de acordo com o método enzimático-gravimétrico AOAC 985.29. A primeira fase do procedimento consiste em tratar a amostra com três enzimas diferentes, a α -amilase, a protease e, por fim, a amiloglucosidase. Depois de fazer diferentes tratamentos com cada uma

destas enzimas, a fibra solúvel é precipitada com etanol. As amostras são filtradas, os resíduos são lavados com etanol e acetona, depois secos e pesados. Um dos duplicados é incinerado, arrefecido e pesado para determinação de cinza, e o segundo usado para determinação de proteína. Ao valor do resíduo seco da filtração é subtraído o valor de cinza e proteína.

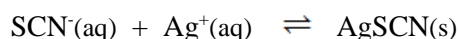
A fibra total, expressa em gramas por 100 gramas de amostra, foi calculada através da seguinte expressão:

$$Fibra = \frac{w - P_{fibra} - C - B}{m} \times 100 \quad (2.10)$$

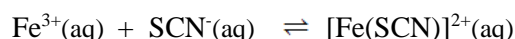
Onde, **w** é a massa do resíduo (diferença entre a massa do cadinho com Celite depois de seco e a massa do cadinho com o resíduo após filtração); **P_{fibra}**, teor de proteína no resíduo; **C** é a cinza do resíduo; **B** é o branco corrigido (subtração entre a massa de resíduo do branco, a cinza do branco e a proteína do branco), **m** é a massa da amostra.

2.2.1.4.6. Determinação do teor de sal

Para determinar do teor de sal nas bolachas seguiu-se o método de Charpentier-Volhard de acordo com o descrito por Albuquerque et al. (2012). Este método envolve uma volumetria por retorno que consiste em precipitar todo o cloreto presente na amostra, adicionando uma solução de nitrato de prata em excesso. A quantidade de cloreto na amostra é deduzida a partir da quantidade de prata que permaneceu por reagir. Para isso, procede-se à sua titulação com uma solução padrão de tiocianato de potássio (KSCN), com formação de um precipitado branco, de acordo com a seguinte equação:



Assim que todo o catião prata é precipitado, o tiocianato reage com o indicador Fe^{3+} , formando-se um complexo solúvel de cor vermelho-alaranjada:



A aplicação desta titulação requer um meio fortemente ácido para evitar a interferência de aniões que precipitam o catião prata (Skoog *et al.*, 2000).

O teor de cloreto de sódio (C_{NaCl}), expresso em gramas por 100 gramas de amostra, foi calculado de acordo com a seguinte expressão:

$$C_{NaCl} = (V - V_1) \times 0.00585 \times \frac{V_T}{V_a} \times \frac{100}{m} \quad (2.11)$$

Onde, **V** é o volume de nitrato de prata (0,1 M); **V₁** o volume de tiocianato de potássio (0,1 M) gasto na titulação; **V_T**, volume total da solução (100 mL); **V_a**, volume da solução pipetado para o ensaio; **m**, a massa da amostra.

2.2.1.4.7. Determinação de hidratos de carbono

Os hidratos de carbono disponíveis (HCD), expressos em gramas por 100 gramas de amostra, foram calculados de acordo com a seguinte expressão:

$$\text{HCD} = 100 - [\text{humidade (g)} + \text{cinza (g)} + \text{proteína total (g)} + \text{gordura total (g)} + \text{fibra (g)}] \quad (2.12)$$

2.2.1.4.8. Determinação da composição em ácidos gordos

Para determinar a composição em ácidos gordos (FAs, do inglês “fatty acid”) seguiu-se o método descrito por Albuquerque *et al.* (2016), que consiste em extrair os lípidos da amostra e convertê-los nos correspondentes esteres metílicos (FAMES, do inglês “fatty acid methyl esters”) através de uma reação de transesterificação alcalina a frio. Os FAMES são posteriormente analisados por cromatografia gasosa (GC).

2.2.2. Preparação dos extratos

2.2.2.1. Extratos brutos de *S. sclareoides*

a) Extração a quente

O material vegetal fragmentado (120 g) (Figura 2.4) foi extraído com etanol a 70% (v/v) durante cerca de 48 horas, usando um extrator de Soxhlet de 1000 mL, de acordo com a montagem da Figura 2.5. Após a evaporação do solvente em evaporador rotativo, foi obtido o extrato etanólico seco.

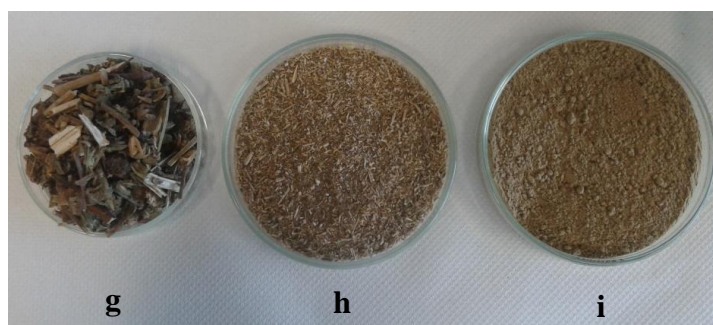


Figura 2.4- *S. sclareoides* seca e fragmentada (g), pulverizada com granulometria de 2,0 mm (h) e de 0,12 mm (i).

O material vegetal pulverizado (60 g) com granulometria de 2,0 mm foi igualmente extraído com etanol a 70% (v/v) usando um extrator Soxhlet de 125 mL (Figura 2.5) com cartucho de extração. Após a evaporação do solvente, sob vácuo, obteve-se o extrato etanólico seco. Foi executado o mesmo procedimento para o material vegetal pulverizado com granulometria de 0,12 mm (60 g), tendo-se obtido o respetivo extrato etanólico seco.

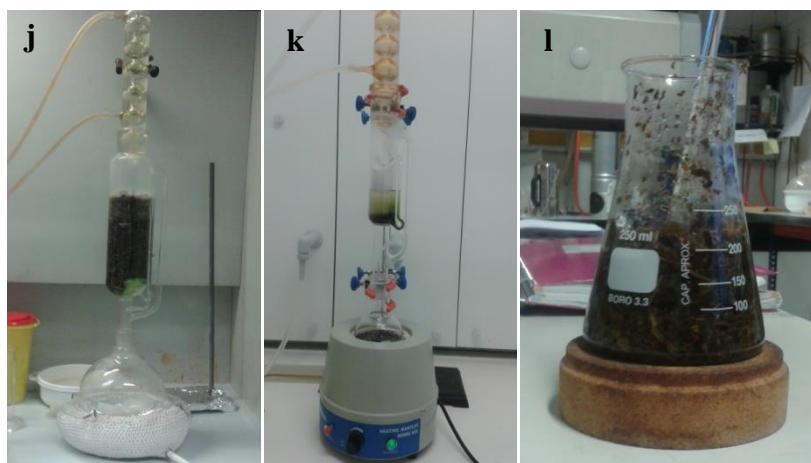


Figura 2.5- Montagem para a extração a quente da *S. sclareoides* fragmentada (j) e pulverizada (k) Extração por infusão em água destilada (l).

Para além dos extratos etanólicos acima referidos, preparou-se ainda um extrato aquoso deixando a planta (20 g) em infusão em água destilada (200 mL) quente (90 °C), durante 20 minutos (Figura 2.5). Após arrefecimento, a infusão foi filtrada (Whatman nº 40), congelada (-18 °C) e, posteriormente, liofilizada, obtendo-se o respetivo extrato aquoso seco.

b) Extração a frio

O material vegetal (120 g) foi colocado numa tina de vidro com etanol a 70% (v/v) (1500 mL) à temperatura ambiente. Após 48 horas de maceração, com agitação intermitente, o macerado foi filtrado através de um funil de Büchner, com papel de filtro (Whatman nº 40) e evaporado à secura, sob vácuo, a 42 °C, obtendo-se o extrato etanólico seco.

2.2.2.2. Extratos de bolachas com *S. sclareoides*

Foram preparados extratos etanólicos das bolachas doces e salgadas, previamente trituradas num moinho de “café”, para posterior determinação dos fenóis totais e da atividade antioxidante dos mesmos.

Na preparação dos extratos das bolachas salgadas usou-se um extrator Soxhlet de 125 mL, um balão de 250 mL e uma manta de aquecimento. Cada amostra (3 x 30 g) foi colocada num cartucho de extração em celulose e os extratos preparados com 250 mL de etanol a 70% (v/v). Os extratos foram evaporados à secura, sob vácuo, a 42 °C, obtendo-se o extrato etanólico seco das bolachas salgadas.

Na preparação dos extratos das bolachas doces, as amostras (80 g) foram colocadas em gobelés de 600 mL, com 180 mL de etanol a 70% (v/v) à temperatura ambiente. Após 48 horas de maceração, com agitação intermitente, o macerado foi filtrado a vácuo através de um funil de Büchner, com papel de filtro (Whatman nº 40) e evaporado à secura em evaporador rotativo, sob vácuo, a 42 °C, obtendo-se o extrato etanólico seco das bolachas doces.

2.2.3. Caracterização química dos extratos

2.2.3.1. Determinação do teor de fenóis totais

O teor de fenóis totais foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu, desenvolvido em 1927 para a quantificação da tirosina (Folin e Ciocalteu, 1927). Baseia-se na redução, a pH alcalino, do reagente de Folin-Ciocalteu (FC), efetuada pelos compostos fenólicos da amostra e que origina o aparecimento de um produto azul com um máximo de absorção a 765 nm, sendo a intensidade da coloração desenvolvida proporcional ao teor em compostos fenólicos. O reagente é uma mistura de molibdato de sódio, tungstato de sódio e outros reagentes e acredita-se que a cor azul da espécie reduzida é devida a um complexo de Mo(v). Este método tem sido amplamente utilizado pela maioria dos investigadores, pela indústria alimentar e agrícola para determinar o teor de compostos fenólicos em extratos vegetais. Contudo, o reagente FC pode reagir com outros antioxidantes não fenólicos presentes na amostra como, por exemplo, proteínas, aminoácidos, hidratos de carbono, nucleótidos, tióis, ácidos gordos insaturados, vitaminas, aminas, aldeídos e cetonas, condicionando o resultado final do ensaio (Everette *et al.*, 2010).

No presente trabalho seguiu-se a metodologia descrita por Rauter et al. (2012), com algumas adaptações.

a) Preparação de soluções padrão de ácido gálico

Pesou-se ácido gálico (5 mg) e dissolveu-se em água destilada, perfazendo o volume para um balão volumétrico de 25 mL (solução-mãe com concentração de 0,20 mg/mL). A partir desta solução prepararam-se soluções-padrão de ácido gálico com concentrações entre 0,03 a 0,20 mg/mL (Tabela 2.1) que foram utilizadas para construir a reta de calibração.

Tabela 2.1 – Preparação dos padrões de calibração

Solução	V _{inicial} (mL)	V _{final} (mL)	C (mg/mL)
Branco	0,0	1,8	0,00
1	0,3	1,8	0,03
2	0,6	1,8	0,07
3	0,9	1,8	0,10
4	1,2	1,8	0,13
5	1,5	1,8	0,17
6	1,8	1,8	0,20

b) Análise do teor de compostos fenólicos totais

Foram preparadas soluções diluídas dos extratos, com água destilada e com uma concentração de 1mg/mL. Em tubos de ensaio, adicionaram-se 100 µL de cada extrato diluído, 100 µL do reagente Folin-Ciocalteu e 2000 µL de uma solução de carbonato de sódio a 2% (p/v), homogeneizou-se no Vortex. Deixou-se repousar durante 30 minutos, à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Findo este tempo, procedeu-se à medição da absorvância dos extratos num espectrofotómetro, a 765 nm, contra um branco preparado da mesma forma, mas substituindo os extratos por água destilada. Todos os extratos foram

analisados em duplicado, tendo a concentração em fenóis sido determinada por interpolação da reta de calibração. O teor em fenóis totais, expressos em mg de equivalentes de ácido gálico (GAE) por g de extrato seco, foi calculado de acordo com a seguinte expressão:

$$C = \frac{c \times V}{m} \quad (2.13)$$

Sendo, **C** o teor em fenóis totais (mg GAE/g de extrato), **c** a concentração de ácido gálico determinada a partir da reta de calibração (mg GA/mL), **V** o volume de solução de extrato vegetal (mL) e **m** a massa de extrato seco (g).

2.2.3.2. Caracterização do perfil fenólico dos extratos

O perfil fenólico dos extratos foi determinado por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de díodos (HPLC-DAD), recorrendo ao uso de diversos padrões.

a) Preparação de soluções

Os extratos (10 mg/ mL), foram preparados numa mistura de água ultrapura e metanol (9:1) usando-se apenas água ultrapura para a preparação dos padrões (1,0 mg/L).

b) Análise cromatográfica

A fase móvel consistiu numa mistura de MeOH (solvente A) e uma solução aquosa a 2,5% de ácido acético (solvente B). O gradiente aplicado foi de 0-5 min: 10% A, 5-10 min: 10-30% A, 10-40 min: 30-90% A, 40-45 min: 90% A, 45-55 min: 90-10% A e 55-60 min: 10% A, utilizando um fluxo de 0,35 mL / min.

O volume de injeção foi de 20 µL com uma velocidade de 200 µL / min. O detetor foi ajustado para os comprimentos de onda de 210, 280, 320 e 350 nm.

Para identificação, os parâmetros de retenção de cada ensaio foram comparados com os padrões de controlo, e a pureza do pico com os dados de referência espectral UV-visível. A quantificação foi feita através de curvas de calibração que relacionam as áreas dos picos com a concentração do composto.

2.2.4. Caracterização biológica dos extratos

2.2.4.1. Determinação da citotoxicidade

A citotoxicidade dos extratos foi avaliada *in vitro* pelo método do MTT. Este método avalia a atividade metabólica das células e baseia-se na redução do reagente MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) pelas desidrogenases mitocondriais (Mosman, 1983). O MTT, de cor amarela, é reduzido nas células metabolicamente ativas, formando cristais de formazano, de cor azul púrpura

(Figura 2.6). Estes, ao serem dissolvidos, absorvem na região do visível, podendo desta forma ser quantificados por espectrofotometria. A quantificação da redução do MTT constitui um método colorimétrico simples para avaliar a viabilidade celular e, indiretamente, a citotoxicidade de diversos fármacos e extratos naturais.

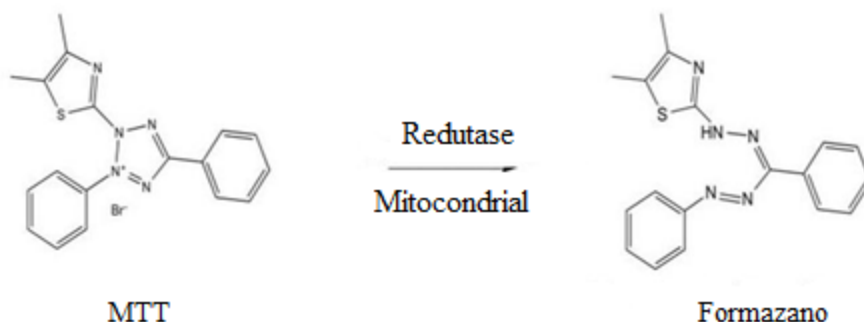


Figura 2.6- Esquema reacional da redução do reagente MTT pelas desidrogenases mitocondriais.

a) Cultura de células

As células Caco-2, cedidas pelo Laboratory of Biochemistry, National Institute for Digestive Diseases, S. de Bellis, Bari (Itália), foram cultivadas em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) rico em glucose, suplementado com soro fetal bovino (10%), glutamina (2mM), penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) e incubadas a 37 °C em atmosfera com 5% de CO₂.

De forma a garantir células suficientes para os ensaios, foram efetuadas diversas passagens da linha celular Caco-2. Para tal, removeu-se o meio de cultura da primeira placa de crescimento e lavou-se a mesma com tampão fosfato salino (PBS, 3 mL). Posteriormente, as células viáveis foram ressuspensas com tripsina (1 mL) e incubadas novamente durante 5 minutos a 37 °C. Após este período, as células foram ressuspensas e semeadas em novas placas de Petri e incubadas nas mesmas condições. Foram efetuadas duas passagens por semana.

b) Ensaio de viabilidade celular

Seguiu-se a metodologia descrita por Carocci et al. (2016). No dia 1, as células foram colocadas em microplaca de 96 poços (100 µL, 10 000 células/poço). No dia 2, foram adicionadas as várias concentrações de extrato (0,5-4 mg/mL) dissolvidos num mínimo de DMSO (< 0,5%) e meio de cultura. Nos poços de controlo foi colocado o mesmo volume (100 µL) de meio de cultura sem extratos. Como composto citotóxico de referência, usou-se DMSO puro (100 µL).

Após 24 horas de incubação (37 °C, 5% CO₂), as microplacas foram observadas ao microscópio invertido. Seguidamente, adicionou-se MTT (0.5 mg/mL; 10 µL) em cada poço da placa, sendo esta colocada novamente na estufa (37 °C, 5% CO₂) durante 3 horas, para a incorporação do MTT e formação dos cristais de formazano. Posteriormente, descartou-se com cuidado o sobrenadante e adicionou-se etanol absoluto (100 µL) em cada poço, para solubilizar os cristais de formazano, colocando-se a microplaca no homogeneizador durante 5 minutos. Por último, realizou-se a leitura das absorvâncias a um comprimento de onda de 570 nm em leitor de microplacas. Os valores de viabilidade celular são expressos em percentagem relativamente à absorvância determinada nas células de controlo, de acordo com a expressão:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{\text{Abs}_{\text{amostra}}}{\text{Abs}_{\text{controle}}} \times 100 \quad (2.14)$$

2.2.4.2. Atividade antioxidante

A atividade antioxidante dos extratos foi determinada através do teste do DPPH. O método consiste em avaliar a atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), de coloração púrpura que absorve a um comprimento de onda de 515 nm. Por ação de um antioxidante (AH) o DPPH é reduzido, formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, podendo esta ser monitorizada pelo decréscimo da absorvância (Figura 2.7) (Sánchez-Moreno, 2002).

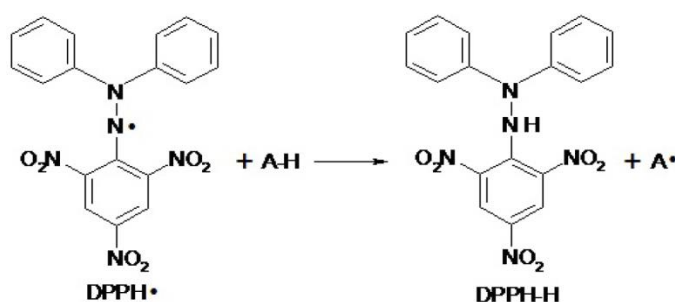


Figura 2.7- Esquema reacional da redução do DPPH.

Para esta determinação seguiu-se a metodologia descrita por Rauter et al. (2012), com algumas adaptações. Para isso, foi necessário preparar soluções diluídas dos extratos, 1 mg/mL, e uma solução de DPPH em metanol com uma concentração de 0,106 mg/mL. Em tubos de ensaio, adicionaram-se 150 µL de cada extrato diluído e 1850 µL do reagente DPPH, homogeneizou-se no Vortex. Deixou-se repousar durante 30 minutos, à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Posteriormente, foi realizada a leitura da absorvância das soluções preparadas, num espectrofotómetro, a 517 nm, contra um branco preparado da mesma forma, mas substituindo o extrato por água destilada. Como controlo positivo, foi testada uma solução aquosa de ácido gálico, nas mesmas condições do ensaio. Todos os extratos foram analisados em triplicado e os resultados expressos em percentagem do efeito de captação do radical DPPH, calculado através da seguinte expressão:

$$\text{Efeito de captação do radical DPPH (\%)} = \frac{(\text{Abs}_{\text{branco}} - \text{Abs}_{\text{amostra}})}{\text{Abs}_{\text{branco}}} \times 100 \quad (2.15)$$

sendo **Abs_{branco}** a absorvância medida no branco, e **Abs_{amostra}** a absorvância medida no ensaio com os extratos.

2.2.4.3. Atividade anticolinesterásica

O método baseia-se na reação da acetilcolina na presença da enzima acetilcolinesterase (AChE), formando-se os produtos acetato e tiocolina. Posteriormente, é adicionado DTNB (5,5'- ditiobis [2-nitrobenzoato]) à tiocolina, formando-se um produto de cor amarela (Figura 2.8). Quando a amostra

analisada possui efeito inibidor sobre a AChE, a coloração amarela vem diminuída, sendo os valores de absorvância obtidos por espectroscopia UV-Vis., a 405 nm.

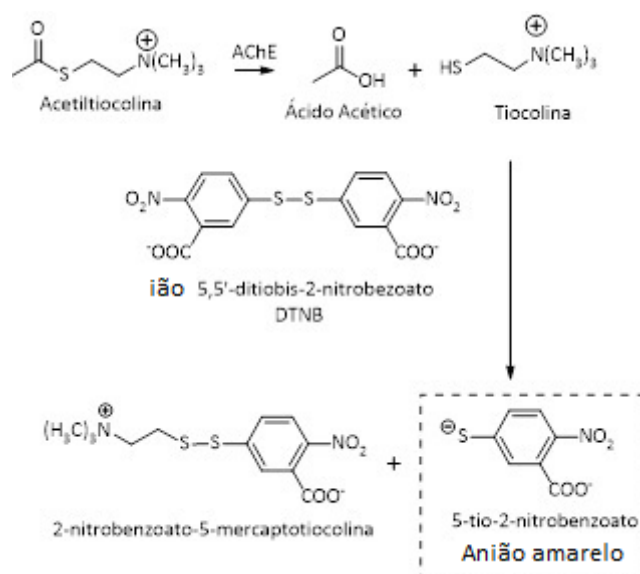


Figura 2.8- Esquema reacional da hidrólise da acetiltiocolina na presença de acetilcolinesterase, formando-se os produtos acetato e tiocolina.

Para a determinação da inibição da atividade da AChE, usou-se a metodologia descrita por Khadri et al. (2016), uma adaptação do método de Ellman anteriormente referida por Ingkaninan et al. (2003). Numa cuvette, colocou-se tampão HEPES (50mM, pH 8, 325 µL), solução aquosa de extrato (10 mg/mL, 100 µL) e solução de acetilcolinesterase contendo 0,26 U/mL (25 µL). A cuvette com a mistura reacional foi incubada durante 15 minutos à temperatura ambiente. De seguida, foram adicionados AChI (0,023 mg/mL, 75 µL) e DTNB (3 mM, 475 µL). A absorvância foi medida de 20 em 20 segundos, e durante 4 minutos, a um comprimento de onda de 405 nm. Para o branco, substituiu-se a enzima pelo tampão HEPES. As medições foram feitas em duplicado.

A percentagem de inibição da atividade da AChE foi calculada pela equação:

$$I (\%) = 100 - \frac{(100 \times V_{\text{amostra}})}{V_{\text{controlo}}} \quad (2.16)$$

sendo **I** a percentagem de inibição da acetilcolinesterase, **V_{amostra}**, a velocidade inicial da reação na cuvette contendo a amostra e **V_{controlo}** a velocidade inicial da reação correspondente ao controlo (sem extrato).

2.2.4.4. Atividade anti-inflamatória

A atividade anti-inflamatória foi avaliada através de um ensaio *in vitro* que determina a capacidade de determinada amostra inibir a desnaturação térmica da albumina, conforme descrito previamente por

Mizushima e Kobayashi (1968). Neste trabalho, foi seguida a metodologia descrita por Williams *et al.* (2002) com pequenas modificações.

Foram preparadas soluções aquosas de albumina de soro bovino (0,2 %), extratos de *S. sclareoides* (500 µg/mL) e ácido acetilsalicílico (100 µg/mL), o fármaco anti-inflamatório de referência.

As soluções a testar (1 mL) foram misturadas com a solução de albumina (1 mL), homogeneizadas e deixadas em repouso, à temperatura ambiente, durante 10 minutos. A desnaturação da albumina foi induzida por aquecimento dos tubos com as várias amostras, em banho de água a 72±1 °C, durante 5 minutos. Após arrefecimento à temperatura ambiente, a turbidez das amostras foi medida a 660 nm num espectrofotómetro de UV-Vis., obtendo-se os valores da absorvância para as amostras ($Abs_{amostras}$) e para o branco ($Abs_{controle}$), em que se substituiu o volume de amostra pelo mesmo volume de água destilada. A percentagem de inibição de desnaturação da albumina foi calculada através da expressão:

$$\% \text{ Inibição} = \left[\frac{Abs_{controle} - Abs_{amostra}}{Abs_{controle}} \right] \times 100 \quad (2.17)$$

Capítulo IV

Conclusões

4. Conclusões

No presente trabalho desenvolveram-se bolachas doces e salgadas com incorporação de diferentes concentrações (2% e 5%) de *S. sclareoides* (pulverizada, com granulometria de 2,0 mm e 0,12 mm). A adição desta planta na formulação das bolachas resultou num produto de aspeto agradável e nutricionalmente interessante.

Em termos de cor, a adição de *S. sclareoides* tornou as bolachas mais escuras conferindo-lhes uma coloração que, de acordo com o sistema CIE L* a* b*, tende para o amarelo e afasta-se do verde. Nas bolachas doces, o aumento da concentração da planta origina diferenças de cor visíveis a olho nu, sendo mais acentuada nas bolachas em que a planta tem uma granulometria superior (2,00 mm). Nas bolachas salgadas, a diferença de cor foi superior com a incorporação da planta de granulometria mais fina (0,12 mm).

As bolachas doces e salgadas com a planta incorporada apontam para uma boa estabilidade ao longo do tempo, uma vez que, em todas elas, os valores de a_w foram inferiores a 0,5.

Em termos de textura, nas bolachas doces observa-se uma tendência para o aumento da dureza com a incorporação de *S. sclareoides*, embora pouco significativas ($p > 0,05$). Deve notar-se que a granulometria parece ter um efeito maior nas propriedades físicas das bolachas doces, visto que com o aumento da granulometria se observa uma redução significativa ($p < 0,05$) da espessura e do a_w .

Para as bolachas salgadas, verifica-se que a adição de *S. sclareoides*, especialmente a 5%, diminui significativamente ($p < 0,05$) a dureza em relação ao controlo. Neste caso, a concentração de *Salvia*, tem um efeito muito marcante nas propriedades físicas, pois assiste-se a uma redução significativa ($p < 0,05$) da espessura e no a_w das bolachas salgadas, que resulta em bolachas muito finas e quebradiças, logo com menor resistência à penetração (ou *bending*).

Relativamente à composição nutricional, destaca-se o teor de fibra alimentar, o qual aumentou consideravelmente com a incorporação de *S. sclareoides*. O elevado teor de fibra das bolachas confere a este alimento grande potencial na prevenção do cancro do cólon e outras doenças do trato intestinal.

Os extratos das bolachas salgadas revelaram a presença de compostos fenólicos, sendo a bolacha com 5% de *S. sclareoides*, de granulometria de 2,0 mm, a que apresentou um teor mais elevado.

A caracterização do perfil fenólico da planta por HPLC-DAD permitiu identificar a rutina, (7-*O*-glucosil)luteolina, epicatequina e ácido elágico como constituintes maioritários dos extratos analisados.

Verificou-se uma boa correlação entre o teor de fenóis totais determinado pelo método de Folin-Ciocateu e a atividade antioxidante, determinada pelo método do DPPH.

Os extratos analisados revelaram possuir atividades antioxidante e anticolinesterásica significativas consideradas relevantes no tratamento das doenças neurodegenerativas. Estas atividades foram igualmente detetadas no extrato da bolacha salgada com 5% de *S. sclareoides* com granulometria de 2,00 mm.

Nas concentrações testadas, e usando o método *in vitro* MTT, os extratos não apresentaram efeito citotóxico em células Caco-2. No entanto, este resultado deve ser confirmado por ensaios *in vivo* de

modo a garantir a inocuidade da incorporação desta espécie de *Salvia* em alimentos e suplementos alimentares.

Para estudos futuros, é essencial testar uma maior gama de concentrações dos diferentes extratos de modo a determinar os valores do IC₅₀ nos diferentes ensaios biológicos, bem como, avaliar as bioatividades por métodos *in vitro* complementares.

Capítulo V

Bibliografía

5. Bibliografia

AACC International Approved Method 44-19.01(1999). Moisture Air-Oven Method, Drying at 135 °C.

Abu-Darwish, M.S., Cabral, C., Ferreira, L.V., Gonçalves, M. J., Cavaleiro, C., Cruz, M. T., Al-bdour, H. e Salgueiro, L., (2013). Essential oil of common sage (*Salvia officinalis* L.) from Jordan: Assessment of safety in mammalian cells and its antifungal and anti-inflammatory potential, *BioMed Research International*, volume 2013, 1-9.

Albuquerque, T.G., Oliveira, M., Sanches-Silva, A., Bento, A. e Costa, H.S. (2016). The impact of cooking methods on the nutritional quality and safety of chicken breaded nuggets. *Food & Function, The Royal Society of Chemistry Journal*, 7, 2736-2746.

Albuquerque, T.G., Sanches-Silva, A., Santos, L. e Costa, H.S. (2012). An update on potato crisps contents of moisture, fat, salt and fatty acids (including trans-fatty acids) with special emphasis on new oils/fats used for frying. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 63, 713-717.

AOAC. (2000). Association of Official Analytical Chemists. In: Official methods of analysis chemists (17th ed.). Washington, DC.

Araújo, C.R.M., Santos, V.L. dos A. e Gonsalves A.A. (2016). Acetilcolinesterase - AChE: uma enzima de interesse farmacológico, *Revista Virtual Química*, 8 (6), 1818-1834.

Artigo 2º da Portaria nº 254, 19 de Março de 2003. Normas técnicas referentes às características e regras de rotulagem, acondicionamento, transporte, armazenagem e comercialização das farinhas destinadas a fins industriais e a usos culinários, bem como das sêmolas destinadas ao fabrico de massas alimentícias e a usos culinários. Diário da República, I Série-B, 2003. Acedido a 12 de setembro de 2017 em: <https://dre.pt/application/file/a/215437>.

Artigo 2º da Portaria nº 1548, 26 de Dezembro de 2002. Refere-se às características a que devem obedecer a margarina e outras emulsões gordas de gorduras e óleos vegetais e ou animais não lácteos, destinadas à alimentação humana e as condições a observar na sua obtenção ou tratamento, bem como as diversas regras sobre a sua comercialização. Diário da Republica, I Série-B, 2002.

Arimi, J.M., Duggan, E., O’Sullivan, M., Lyng, J.G. e O’Riordan, E.D. (2010). Effect of water activity on the crispiness of a biscuit (Crackerbread): Mechanical and acoustic evaluation. *Food Research International*, 43, 1650-1655.

Batista, A.P., Bursic, I., Miranda, A., Fragoso, S., Fradinho, P., Raymundo, A. e Sousa, I. (2017). Rheological characterization of *Spirulina* gluten-free cookie doughs. In “The Multidisciplinary Science of Rheology – Towards a healthy and sustainable development”, Eds. M.J. Hernández, T. Sanz, A. Salvador, F.J. Rubio-Hernández, R. Steinbruggen, Valência, Espanha, 20-23.

Carter, B.P., Galloway, M.T., Campbell, G.S. e Carter, A.H. (2015). The critical water activity from dynamic dewpoint isotherms as an indicator of crispness in low moisture cookies, *Journal of food measurement and characterization*, 9, 463-470.

Carocci, A., Catalano, A., Turi, F., Lovece, A., Cavalluzzi, M.M., Bruno, C., Colabufo, N.A., Contino, M., Perrone, M.G., Franchini, C. e Lentini, G. (2016). Stereoselective modulation of P-glycoprotein by chiral small molecules. *ChemMedChem, Chemistry enabling drug discovery*, 11, 93-101.

Castellar, M.R., Obón, J.A. e Fernández-López (2006). The isolation and properties of a concentrated red-purple betacyanin food colorant from *Opuntia stricta* fruits. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 122–128. Acedido a 2 de junho de 2017 em: <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.2285.ghmetyuke6y7>.

Composição de alimentos, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA). Acedido a 22 de setembro de 2017 em: <http://portfir.insa.pt/foodcomp/foodcompare?foodId=778&foodId=781>.

Czernohorsky, J.H. e Hooker, R. The chemistry of baking, New Zealand Institute for Crop and Food Research. Acedido a 21 de setembro de 2017 em: <https://nzic.org.nz/ChemProcesses/food/6D.pdf>.

Decreto-Lei nº 106/2005 de 29 de Junho. Estabelece as características das gorduras e dos óleos vegetais destinados à alimentação humana, as condições a observar na sua obtenção ou tratamento, bem como as regras da sua comercialização, e o respetivo regime sancionatório.

Dziurzynski, T., Lidwiczuk, A. e Glowinski, K. (2013). Biological activities of *Salvia L.* species, *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences*, 26 (3), 326-330.

Everette, D., Bryant, Q., Green, A., Abbey, Y. e Wangila, G. (2010). Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin-Ciocalteu reagent. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 58, 8139–8144.

Farhata, M.B., Landoulsia, A., Chaouch-Hamadaa, R., Sotomayor, J.A. e María J.J. (2013). Characterization and quantification of phenolic compounds, and antioxidant properties of *Salvia* species growing in different habitats, *Industrial Crops and Products*, 49, 904-914.

Farhata, M.B., Landoulsia, A., Chaouch-Hamadaa, R., Sotomayor, J.A. e María J.J. (2013). Phytochemical composition and in vitro antioxidant activity of by-products of *Salvia verbenaca L.* growing wild in different habitats, *Industrial Crops and Products*, 49, 373– 379.

Ferreira, I., Abreu, R. (2007). Stress oxidativo, antioxidantes e fitoquímicos, *Sociedade Portuguesa de BioAnalistas da Saúde*, 2, 32-39.

Flora de Portugal interativa, acedido a 10 de junho de 2017 em: <http://flora-on.pt/>.

Folin, O. e Ciocalteu, V. (1927). Tyrosine and tryptophan determination in proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 73, 649-673.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO): Methods of food analysis. Acedido a 12 de setembro de 2017 em: <http://www.fao.org/docrep/006/Y5022E/y5022e03.htm#TopOfPage>.

Food fats and oils (2016). *Institute of Shortening and Edible Oils*, tenth edition, 1-25.

Greenfield, H. e Southgate, D.A.T. (2003). Food composition data, Production, Management and use. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2nd edition, Rome.

Halliwell, B. (2007). Biochemistry of oxidative stress, *Biochemical Society Transactions*, 35, 1147-1150.

Ingkaninan, K., Temkitthawon, P., Chuenchom, K., Yuyaem, T. e Thongnoi, W. (2003). Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in Thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies. *Journal of Ethnopharmacology* 89, 261-264.

Jardim Botânico da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. Acedido a 10 de junho de 2017 em: <https://jb.utad.pt/>.

Jassbi, A., Zare, S., Firuzi, O. e Xiao, J. (2016). Bioactive phytochemicals from shoots and roots of *Salvia* species. *Phytochem Review*, Springer, 15, 829-867.

Jash, S., Gorai, D., Roy, R. (2016). *Salvia* genus and triterpenoids. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 7 (12), 4710-4732.

Jorge, A., Loureiro, J., Castro, S. (2015). Flower biology and breeding system of *Salvia sclareoides* Brot. (Lamiaceae), Springer, *Plant Systematics and Evolution*, 301, 1485-1497.

Kamatou, G., Viljoen, M., Steenkamp, P. (2010). Antioxidant, anti-inflammatory activities and HPLC analysis of South African *Salvia* species, *Food Chemistry*, 119, 684-688.

Khadhri, A., Bouali, I., Belkhir, S., Mokded, R., Smiti, S., Falé, P., Araújo, M.E.M. e Serralheiro, M.L.M. (2016). *In vitro* digestion, antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of two species of *Ruta*: *Ruta chalepensis* and *Ruta montana*. *Pharmaceutical Biology*, 55 (1), 101-107.

Kaushal, P., Kumar, V. e Sharma, H. K. (2012). Comparative study of physicochemical, functional, antinutritional and pasting properties of taro (*Colocasia esculenta*), rice (*Oryza sativa*) flour, pigeonpea (*Cajanus cajan*) flour and their blends. *Food Science and Technology*, 48, 59-68.

Leach, H.W., McCowen, I.D. e Schoch, T.J. (1959). Structure of the starch granule. I. Swelling and solubility patterns of various starches. *Cereal Chemistry*, 36, 534-544.

Lopresti, A.L. (2017). *Salvia* (Sage): A review of its potential cognitive-enhancing and protective effects. *Drugs R D*, 17, 53-64.

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C. e Jimenez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability, *American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 727-747.

Manley, D. (1998). Biscuit, Cookie and Cracker Manufacturing: Manual 1-Ingredients, Woodhead Publishing Limited, Cambridge-England.

Manley, D. (2000). Technology of biscuits, crackers and cookies. Cambridge, Inglaterra: CRC Press - Woodhead Publishing Ltd.

- Marcelo, M., Dias, C., Martins, A., Madeira, P.J., Jorge, T., Florêncio, M.H., Cañada, F.J., Cabrita, E.J., Jiménez-Barbero, J. e Rauter, A.P. (2013). Molecular recognition of rosmarinic acid from *Salvia sclareoides* extracts by acetylcholinesterase: a new binding site detected by NMR spectroscopy. *Chemistry*, 19, 6641-6649.
- Mizushima, Y., Kobayashi, M. (1968). Interaction of anti-inflammatory drugs with serum proteins, especially with some biologically active proteins. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 20(3), 169-173.
- Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays". *Journal of Immunological Methods*, 65 (1-2), 55-63.
- Nielsen, S.S. (2009). Food analysis, fourth edition, Springer.
- Pereira, D., Correia, P.M.R. e Guiné, R.P.F. (2013). Analysis of the physical-chemical and sensorial properties of Maria type cookies. *Ata Chimica Slovaca*, 6 (2), 269-280.
- Proença da Cunha, A. (2003). Plantas aromáticas em Portugal. Caracterização e utilizações, Ed. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 213-214.
- Projeto Mais, Produtos Funcionais. Acedido a 26 de setembro de 2017 em: <http://www.portugalfoods.org/produtosfuncionais/analise-de-mercado/envolvente-externa-a-saude>.
- Rahman, M.S. (2007). Handbook of food preservation, second edition, CRC Press.
- Raymundo, A., Fradinho, P. e Nunes, M.C. (2014). Developing consumer acceptable biscuits enriched with Psyllium fibre. *Journal Food Science Technology*, 52(8), 4830-4840.
- Rauter, A.P., Branco, I., Lopes, R.G., Justino, J., Silva, F.V.M., Noronha, J.P., Cabrita, J.E., Brouard, I. e Bermejo, J. (2007). A new lupene triterpenetriol and anticholinesterase activity of *Salvia sclareoides*, *Fitoterapia*, 78, 474-481.
- Rauter, A.P., Dias, C., Martins, A., Branco, I., Neng, N.R., Nogueira, J.M., Goulart M., Silva, F., Justino, J., Trevitt, C. e Waltho, J.P. (2012). Non-toxic *Salvia sclareoides* Brot. extracts as a source of functional food ingredients: Phenolic profile, antioxidant activity and prion binding properties, *Food Chemistry*, 132, 1930-1935.
- Regulamento (UE) N° 1169/2011 do Parlamento Europeu e do conselho de 25 de Outubro de 2011 relativo à prestação de informação aos consumidores sobre os géneros alimentícios.
- Sánchez-Moreno, C. (2002). Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology*, 8, 121-137.
- Sáez-Plaza, P., Navas, M.J., Wybraniec, S., Michałowski, T. e Asuero, A.G. (2013). An overview of the Kjeldahl method of nitrogen determination. Part II. Sample preparation, working scale, instrumental finish, and quality control. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 43, 224-272.
- Sahin, S., Sumnu, S.G. (2005). Physical properties of foods, Springer.

Salimikia, I., Monsef-Esfahani, H.R., Gohari, A.R. e Salek, M. (2016). Phytochemical analysis and antioxidant activity of *Salvia chloroleuca* aerial extracts. *Iranian Red Crescent Medical Journal*, 18(8), 1-5.

Skoog, D., West, D., Holler, F. e Crouch, S. (2000). *Analytical Chemistry: An Introduction*. 7th edition, Saunders College, Florida.

Sumnu, S.G. e Sahin, S. (2008). Food engineering aspects of baking sweet goods, CRC Press.

Temel, E.H., Demirci, B., Demirci, F., Celep, F., Kahraman, A., Doğan, M. e Başer, K.H.C. (2016). Chemical characterization and anticholinesterase effects of essential oils derived from *Salvia* species. *Journal of essential oil research*, 28(4), 322-331.

Vladimir-Knežević, S., Blažeković, B., Kindl, M., Vladić, J., Lower-Nedza, A.D. e Brantner, A.H. (2014). Acetylcholinesterase inhibitory, antioxidant and phytochemical properties of selected medicinal plants of the Lamiaceae family, *Molecules*, 19, 767-782.

Williams, L.A.D., O'Connar, A, Latore, L, Dennis, O., Ringer, S, Whittaker, J.A., Conrad, J., Vogler, B., Rosner, H. e Kraus, W. (2008). The *in vitro* anti-denaturation effects induced by natural products and non-steroidal compounds in heat treated (immunogenic) bovine serum albumin is proposed as a screening assay for the detection of anti-inflammatory compounds, without the use of animals, in the early stages of the drug discovery process. *West Indian Medical Journal*, 57 (4), 327-331.